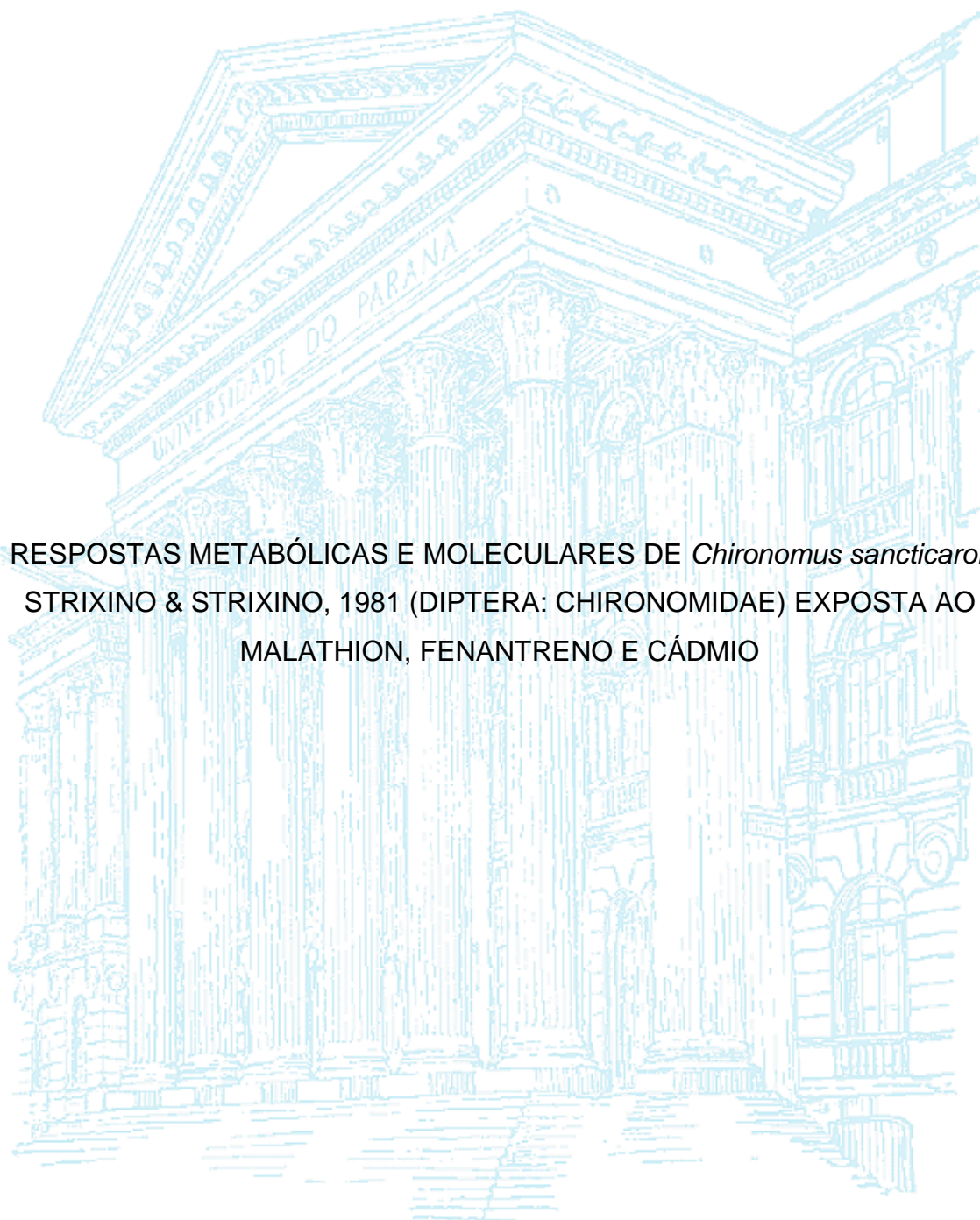


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA REBECHI BAGGIO



RESPOSTAS METABÓLICAS E MOLECULARES DE *Chironomus sancticaroli*  
STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EXPOSTA AO  
MALATHION, FENANTRENO E CÁDMIO

CURITIBA

2016

DÉBORA REBECHI BAGGIO

RESPOSTAS METABÓLICAS E MOLECULARES DE *Chironomus sancticaroli*  
STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EXPOSTA AO  
MALATHION, FENANTRENO E CÁDMIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Antônio Navarro da Silva

CURITIBA

2016

DÉBORA REBECHI BAGGIO

"RESPOSTAS METABÓLICAS E MOLECULARES DE *Chironomus  
sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)  
EXPOSTA AO MALATHION, FENANTRENO E CÁDMIO"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de  
Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela  
Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Orientador)  
(UFPR)



Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez  
(UEL)



Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf  
(UFPR)



Profa. Dra. Helena Cristina da Silva Assis  
(UFPR)



Profa. Dra. Izonete Cristina Guiloski  
(Pós-doc UFPR)

Curitiba, 25 de fevereiro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia por toda a estrutura fornecida para a realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Mário, pela orientação desde 2008, foram muitos anos de aprendizagem, muitas conversas e esclarecimentos de como agir nas mais diversas situações, como avançar com os erros, como fazer e pensar sobre ciência, o nosso papel como pesquisadores, como lidar com a burocracia e o dinheiro público, como retribuir para a sociedade e fazer a diferença. Acompanhar a sua rotina me fez crescer e vivenciar pelo menos um pouco a posição de professor universitário. Agradeço por todas essas experiências que com certeza ajudaram a direcionar o meu perfil profissional.

À Universidade da Califórnia Davis, ao Prof. Dr. Richard Connon pela co-orientação durante o estágio sanduíche e toda a equipe do Connon' lab, Ken, Simone, Matthias, Daniel, Sarah e Laura. Foram cinco meses incríveis na Califórnia, nunca esquecerei o que vivi e todo o aprendizado que envolve uma experiência como essa. A parceria com laboratórios internacionais é extremamente valiosa e enriquecedora para a ciência e para os pesquisadores.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Entomologia pelas aulas, discussões e contribuição em minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e taxa de bancada do doutorado no Brasil e a CAPES pela bolsa do doutorado sanduíche. O investimento na educação é essencial e faz toda a diferença.

Ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e a doutoranda Simone Braga da Silva, ambos do Grupo de Química Ambiental do Departamento de Química da UFPR pelo suporte e ajuda nas quantificações de cádmio.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos do Centro de Pesquisa em Química Aplicada do Departamento de Química da UFPR pela disponibilização do equipamento utilizado nas quantificações de malathion e fenantreno e ao doutorando Thiago Alexandre da Silva pela realização dessas quantificações.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis do Laboratório de Toxicologia Ambiental pela disponibilidade de seu laboratório e a Cris e Letícia pela ajuda com alguns protocolos bioquímicos e moleculares. A parceria entre os nossos laboratórios é muito boa, obrigada pela dedicação.

À Profª Drª Maria Cristina Borba Braga do Departamento de Hidráulica e Saneamento pela disponibilização do equipamento utilizado nas análises de qPCR e a Drª. Maria Carolina Vieira da Rocha por me auxiliar com a utilização do equipamento.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV), Ana, Ana Mazza, Angela, Betina, Emili, Gisele, Isadora, Mário, Monique, Oscar, Thalita, Tiago, por todos os momentos de confraternização e convivência no laboratório, vocês fizeram com que esses quatro anos fossem agradáveis e prazerosos. Especialmente a Maiara, melhor estagiária que alguém poderia pedir, por toda a ajuda, amizade e principalmente paciência com os incontáveis experimentos e ensaios enzimáticos e ao Vinicius, o amigo/padrinho que os Chironomidae me deram, foram tantas coisas juntos que é difícil descrever, tantos aprendizados, decepções, acertos, erros, discussões, frustrações, surpresas e felicidades, mas sempre juntos, tenho orgulho em dizer que caminhamos lado a lado e o que sabemos hoje foi fruto da nossa dedicação. Obrigada brother, você é mara.

A todos os meus amigos: do colégio, da graduação e da pós-graduação, que estavam ao meu lado em todos os momentos. Em especial ao Flávio, Bruna, Endrio, Amanda, Liarinha, Ana, Cezar e Quito, por tantos momentos de descontração, vocês são demais!

A banca examinadora por todas as valiosas considerações.

A minha família maravilhosa. Minhas irmãs Denise e Viviane, meus cunhados, Yuri e Christiano, minhas sobrinhas lindas, Letícia e Bianca e meu sobrinho querido André, pela presença constante e apoio. Vocês são essenciais.

Aos meus pais, Vilson e Solange, pessoas sensacionais que fizeram a nossa família unida e estruturada em valores de bem. Agradeço a dedicação, apoio, carinho e amor incondicional. Sucesso define vocês!

Ao meu marido e melhor amigo, Rafael. Pessoa que mais compreende tudo o que passei nesse doutorado e agradeço diariamente pela nossa família. Você é incrível e difícil são as palavras para descrever o quanto sou grata por ter você ao meu lado, me apoiando. Você é meu porto seguro. Te amo.

Com carinho,  
Débora

## RESUMO

A complexidade das inúmeras combinações de xenobióticos nos ambientes aquáticos representa um grande desafio para a avaliação do risco ecológico. A espécie bioindicadora *Chironomus sancticaroli* foi utilizada como modelo de exposição para se compreender os efeitos individuais e das misturas combinadas do metal cádmio, do inseticida organofosforado malathion e do hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno, poluentes que representam diferentes classes de xenobióticos amplamente encontrados em lugares impactados no mundo. As larvas de IV ínstar foram expostas por 48h a três concentrações nominais de cádmio (0,001, 3,2 e 7,4 mg L<sup>-1</sup>), malathion (0,0001, 0,0564 e 0,1006 mg L<sup>-1</sup>) e fenantreno (0,0025, 1,25 e 2,44 mg L<sup>-1</sup>), além dos controles água e solvente (etanol p.a.). As menores concentrações de cada poluente representam o máximo permitido pela legislação brasileira para rios de Classe 1 e 2 e as outras duas concentrações representam, as concentrações letais CL<sub>25</sub> e CL<sub>50</sub> previamente calculadas de cada composto para a espécie. Foram quantificadas as concentrações biodisponíveis dos poluentes em todos os experimentos para se confirmar as concentrações nominais. Foi utilizada a abordagem de unidades tóxicas para se prever a toxicidade das misturas. Os biomarcadores utilizados foram as atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST alfa), esterase beta (EST beta), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), os danos de peroxidação lipídica (LPO), o conteúdo total de hemoglobinas (Hb) e a expressão gênica de quatro hemoglobinas: HbB, HbC, HbD e HbE. Nas larvas de *Chironomus sancticaroli*, os biomarcadores bioquímicos foram mais sensíveis aos efeitos provocados pelo malathion, em seguida o cádmio e fenantreno. As misturas binárias e terciárias provocaram mais efeitos que as exposições individuais para todos os poluentes. Dentre as misturas, a exposição binária cádmio + malathion e a exposição terciária cádmio + malathion + fenantreno foram as mais tóxicas para a espécie. Com base nos resultados os três poluentes podem ser considerados neurotóxicos, capazes de gerar alterações metabólicas e estresse oxidativo, gerando os danos de peroxidação lipídica e as alterações no conteúdo e expressão gênica de hemoglobinas em *Chironomus sancticaroli*. As interações observadas entre os xenobióticos investigados poderão auxiliar no direcionamento de futuros estudos diretamente ligados à avaliação de risco ecológico e conservação da biota dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: metal, inseticida, HPA, biomarcadores bioquímicos, expressão gênica.

## ABSTRACT

The complexity of numerous combinations of xenobiotics in aquatic environments represents a major challenge for ecological risk assessment. In this thesis, the bioindicator species *Chironomus sancticaroli* was used as a model organism to assess the individual and combined effects of the metal cadmium, the organophosphate insecticide malathion and polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene, pollutants that represent different classes of xenobiotics widely detected in impacted areas worldwide. IV instar larvae were exposed for 48 hours at three nominal concentrations of cadmium (0.001, 3.2 and 7.4 mg L<sup>-1</sup>), malathion (0.0001, 0.0564 and 0.1006 mg L<sup>-1</sup>), and phenanthrene (0.0025, 1.25 and 2.44 mg L<sup>-1</sup>), water and solvent (ethanol p.a.) controls. The lowest concentrations of each pollutant represent the maximum limit allowed by Brazilian law to Class 1 and 2 rivers, while the other two concentrations represent the lethal concentrations LC<sub>25</sub> and LC<sub>50</sub> previously calculated for each compound for the species. The bioavailable concentrations of the pollutants were quantified in all experiments to confirm nominal concentrations. The toxic unit (TU) approach was used to predict mixture toxicity. Measured biomarkers were the enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE), esterase alpha (EST alpha), esterase beta (EST beta), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), the lipid peroxidation damage (LPO), the total content of hemoglobin (Hb) and gene expression of four hemoglobins: HbB, HbC, HbD and HbE. Biochemical biomarkers of the larvae of *Chironomus sancticaroli* were most sensitive to measure effects caused by malathion, followed by cadmium and phenanthrene. Compared to individual exposures, both binary and tertiary mixtures caused synergistic responses. Among the mixtures, the binary exposure cadmium + malathion and the tertiary exposure cadmium + malathion + phenanthrene were the most toxic to *Chironomus sancticaroli*. Based on these results, all three pollutants can be considered neurotoxic, capable of generating a high degree of metabolic and oxidative stress, potentially causing lipid peroxidation damage and changes in hemoglobin content and as well as gene expression. The observed interactions between the investigated xenobiotics may assist in future studies supporting ecological risk evaluation and conservation of the aquatic ecosystem.

Key-words: metal, pesticide, PAH, biochemical biomarkers, gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do inseticida malathion .....	4
FIGURA 2: Reação de degradação da acetilcolina .....	5
FIGURA 3: Estrutura química do hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno.....	7
FIGURA 4: Reação de Fenton .....	10
FIGURA 5: Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	13
FIGURA 6: Representação do funcionamento do sistema nervoso em condições normais (quadro verde e amarelo) e em condição alterada (quadro vermelho) .....	15
FIGURA 7: Reação de conjugação realizada pela glutathione S-transferase (GST) ..	16
FIGURA 8: Nome, fórmula molecular e fórmula eletrônica das ERO .....	17
FIGURA 9: Fluxograma indicativo das atividades realizadas .....	21
FIGURA 10: Aquários utilizados para a criação da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	22
FIGURA 11: Sala de criação com imagens das bandejas utilizadas para a separação das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> para realização dos bioensaios. 1 – Aspecto geral da disposição das bandejas na sala; 2 – Detalhe da bandeja (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm; com capacidade para 7 L) contendo larvas de IV ínstar inicial e aeração constante .....	24
FIGURA 12: Representação esquemática dos recipientes dos bioensaios de toxicidade aguda. Recipiente de vidro com capacidade para 300 ml, contendo 100 ml de soluções teste e 13 g de sedimento. Os círculos pretos indicam o posicionamento de algumas larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> no interior do sedimento .....	27
FIGURA 13: Espectrofotômetro de massas Varian 320MS utilizado para as determinações de malathion e fenantreno .....	31
FIGURA 14: Potenciostato utilizado para as determinações de cádmio. Detalhe da célula voltamétrica e dos eletrodos utilizados .....	31
FIGURA 15: Imagem das microplacas do ensaio enzimático com as enzimas (A) acetilcolinesterase; (B) esterase alfa; (C) esterase beta; (D) glutathione S-transferase; (E) superóxido desmutase. Quantificações totais de (F) hemoglobinas e (G) proteínas. (H) Imagem do espectrofotômetro de microplacas SpectraMax 190 .....	35
FIGURA 16: Curvas padrão do ensaio enzimático com as enzimas (A) esterase alfa; (B) esterase beta; (C) conteúdo total de hemoglobina; (D) proteínas ..	37
FIGURA 17: Concentrações Letais $CL_{50} - 48h$ ( $g L^{-1}$ ) para cada um dos 20 testes realizados, bem como o limite superior e inferior da faixa sensibilidade de <i>Chironomus sancticaroli</i> ao Cloreto de Potássio (KCl) .....	47
FIGURA 18: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Malathion ao longo dos experimentos com <i>Chironomus sancticaroli</i> . A: exposição individual de malathion, B: exposição da mistura binária de malathion e	



fenantreno. C1 = concentração 1 (0,0001 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  .....51

FIGURA 19: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Malathion ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição da mistura binária de malathion e cádmio, B: exposição da mistura terciária de malathion, cádmio e fenantreno. C1 = concentração 1 (0,0001 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  .....52

FIGURA 20: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Fenantreno ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição individual de fenantreno; B: exposição da mistura binária de malathion e fenantreno. C1 = concentração 1 (0,0025 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (1,25 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (2,44 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  .....53

FIGURA 21: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Fenantreno ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição da mistura binária de fenantreno e cádmio, B: exposição da mistura terciária de fenantreno, cádmio e malathion. C1 = concentração 1 (0,0025 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (1,25 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (2,44 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  .....54

FIGURA 22: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Cádmio ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição individual de cádmio; B: exposição da mistura binária de cádmio e malathion. C1 = concentração 1 (0,001 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (3,2 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (7,4 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  .....55

FIGURA 23: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Cádmio ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição da mistura binária de cádmio e fenantreno; B: exposição da mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno. C1 = concentração 1 (0,001 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (3,2 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (7,4 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  .....56

FIGURA 24: Modelos CA, IA e a toxicidade observada para: (A) mistura binária de malathion e fenantreno; (B) mistura binária de cádmio e malathion; (C) mistura binária de cádmio e fenantreno; (D) mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno. Modelo CA = previsão de acordo com o modelo *concentration addition*; Modelo IA = previsão de acordo com o modelo *independent action*; Mistura – Observado = toxicidade observada para a mistura.....61

FIGURA 25: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do inseticida malathion por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). A - acetilcolinesterase (AChE); B – glutational S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E – catalase (CAT); F – superóxido dismutase (SOD). Os

resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn) .....63

FIGURA 26: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do inseticida malathion por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn) .....64

FIGURA 27: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição ao malathion e os respectivos biplots. M\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....66

FIGURA 28: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn) .....68

FIGURA 29: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn) .....69

FIGURA 30: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição ao fenantreno e os respectivos biplots. F\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....71

FIGURA 31: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do metal cádmio por 48h (CA = controle água). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....73

- FIGURA 32: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do metal cádmio por 48h (CA = controle água). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....74
- FIGURA 33: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição ao cádmio e os respectivos biplots. C\_CA = controle água (símbolo redondo preto); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....75
- FIGURA 34: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). A - acetilcolinesterase (AChE); B – glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E – catalase (CAT); F – superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn). ....77
- FIGURA 35: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....78
- FIGURA 36: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de malathion com fenantreno e os respectivos biplots. MF\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); MF\_C1 = mistura C1 de M+F; MF\_C2 = mistura C2 de M+F; MF\_C3 = mistura C3 de M+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....80
- FIGURA 37: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do metal cádmio e do inseticida malathion por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion). A - acetilcolinesterase (AChE); B – glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E –

catalase (CAT); F – superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn) .....82

FIGURA 38: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do metal cádmio e do inseticida malathion por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....83

FIGURA 39: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de cádmio com malathion e os respectivos biplots. CM\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); CM\_C1 = mistura C1 de C+M; CM\_C2 = mistura C2 de C+M; CM\_C3 = mistura C3 de C+M (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....84

FIGURA 40: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do metal cádmio e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). A - acetilcolinesterase (AChE); B – glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E – catalase (CAT); F – superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn) .....86

FIGURA 41: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do metal cádmio e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....87

FIGURA 42: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de cádmio com fenantreno e os respectivos biplots. CF\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); CF\_C1 = mistura C1 de C+F; CF\_C2 = mistura C2 de C+F; CF\_C3 = mistura C3 de C+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....88

- FIGURA 43: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticarloi* expostos à mistura do metal cádmio, do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....90
- FIGURA 44: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticarloi* expostos à mistura do metal cádmio, do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).....91
- FIGURA 45: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de cádmio, malathion e fenantreno e os respectivos biplots. CMF\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); CMF\_C1 = mistura C1 de C+M+F; CMF\_C2 = mistura C2 de C+M+F; CMF\_C3 = mistura C3 de C+M+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento .....92
- FIGURA 46: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao malathion, fenantreno e mistura binária de malathion e fenantreno. M\_CS / F\_CS / MF\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion; F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno; MF\_C1 = mistura C1 de M+F; MF\_C2 = mistura C2 de M+F; MF\_C3 = mistura C3 de M+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento.....96
- FIGURA 47: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao cádmio, malathion e mistura binária de cádmio e malathion. C\_CA = controle água; M\_CS / CM\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio; M\_C1 = concentração C1 de malathion;

M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion; CM\_C1 = mistura C1 de C+M; CM\_C2 = mistura C2 de C+M; CM\_C3 = mistura C3 de C+M (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento ..... 100

FIGURA 48: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao cádmio, fenantreno e mistura binária de cádmio e fenantreno. C\_CA = controle água; F\_CS / CF\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio; F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno; CF\_C1 = mistura C1 de C+F; CF\_C2 = mistura C2 de C+F; CF\_C3 = mistura C3 de C+F (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento ..... 104

FIGURA 49: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao cádmio, malathion, fenantreno e mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno. C\_CA = controle água; M\_CS / F\_CS / CMF\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio; M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion; F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno; CMF\_C1 = mistura C1 de C+M+F; CMF\_C2 = mistura C2 de C+M+F; CMF\_C3 = mistura C3 de C+M+F (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento ..... 108

FIGURA 50: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao inseticida malathion por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 109

FIGURA 51: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 110

- FIGURA 52: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao metal cádmio por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CA = controle água. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 111
- FIGURA 53: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas à mistura binária de malathion e fenantreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 113
- FIGURA 54: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas à mistura binária de cádmio e malathion por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 114
- FIGURA 55: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas à mistura binária de cádmio e fenantreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 115
- FIGURA 56: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas à mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno por 48h. A =

hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  ..... 116



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Concentrações utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda com malathion, fenantreno, cádmio e suas misturas binárias e terciárias em *Chironomus sancticaroli*. UT = Unidades tóxicas .....28
- TABELA 2: Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de  $\text{Cd}^{2+}$  por voltametria de redissolução anódica (DPASV) de pulso diferencial .....32
- TABELA 3: Volume das alíquotas utilizadas para cada enzima ou conjunto de enzimas e seu respectivo recipiente de armazenamento.....34
- TABELA 4: Sequências dos primers utilizados para expressão gênica da HbB, HbC, HbD, HbE e actina em *Chironomus sancticaroli* .....43
- TABELA 5: Valores da Concentração Letal ( $\text{CL}_{50} - 48\text{h}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) do Cloreto de Potássio (KCl) e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de sensibilidade com *Chironomus sancticaroli*.....46
- TABELA 6: Concentrações nominais e as mensuradas do malathion, fenantreno e cádmio no tempo 0h dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. M = malathion; M+F = malathion e fenantreno; C+M = cádmio e malathion; M+C+F = malathion, cádmio e fenantreno; F = fenantreno; C+F = cádmio e fenantreno; C = cádmio; C1 = concentração 1; C2 = concentração 2; C3 = concentração 3.....48
- TABELA 7: Faixa letal dos poluentes malathion, fenantreno e cádmio para espécie *Chironomus sancticaroli* expressa em  $\text{mg L}^{-1}$  e seus intervalos de confiança (IC) .....57
- TABELA 8: Porcentagem de mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda (48h) com malathion, fenantreno, cádmio e suas misturas. V = larvas vivas; P = larvas predadas; D = larvas desaparecidas; m = larvas vivas com espasmos musculares; M = larvas mortas. Tratamentos: controle água, controle solvente, C1 = concentração 1, C2 = concentração 2, C3 = concentração 3.....58
- TABELA 9: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao malathion, fenantreno e a mistura de malathion e fenantreno. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 =  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C2 =  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C3 =  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno .....95
- TABELA 10: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente

em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion e a mistura de cádmio e malathion. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 =  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion; C2 =  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion; C3 =  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion ..... 99

TABELA 11: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, fenantreno, e a mistura de cádmio e fenantreno. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 =  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C2 =  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C3 =  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno..... 103

TABELA 12: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion e fenantreno, e a mistura de cádmio, malathion e fenantreno. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 =  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C2 =  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C3 =  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno ..... 107

TABELA 13: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbD em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao malathion, fenantreno e a mistura de malathion e fenantreno. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CS = controle solvente; C1 =  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C2 =  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno; C3 =  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion +  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno ..... 120

TABELA 14: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbD em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion, e a mistura de cádmio e malathion. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 =  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion; C2 =  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$

de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion ..... 120

TABELA 15: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbD em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, fenantreno, e a mistura de cádmio e fenantreno. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno ..... 121

TABELA 16: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbD em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion, fenantreno, e a mistura de cádmio, malathion e fenantreno. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno ..... 121

**LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1: Classificação das águas-doces de Classe 1, 2, 3 e 4 segundo CONAMA (resolução 357, de 17 de março de 2005).....	6
--	---

## LISTA DE SIGLAS

<b>ACh</b>	Neurotransmissor acetilcolina
<b>AChE</b>	Enzima acetilcolinesterase
<b>ATC</b>	Iodeto de acetiltiocolina
<b>ATSDR</b>	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
<b>BSA</b>	albumina soro bovina
<b>CAT</b>	Enzima catalase
<b>CA</b>	<i>Concentration addition</i>
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
<b>CL<sub>25</sub></b>	Concentração letal para 25% da população
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração letal para 50% da população
<b>CLs</b>	Concentrações letais
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>ChE</b>	Colinesterases
<b>DZUP</b>	Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure da UFPR
<b>DPASV</b>	Voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial
<b>DTNB</b>	5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato
<b>EC</b>	Concentrado emulsionável
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EST –<math>\alpha</math></b>	Enzima esterase alfa
<b>EST – <math>\beta</math></b>	Enzima esterase beta
<b>EW</b>	Emulsão de óleo em água
<b>GST</b>	Enzima glutathiona S-transferase
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>GPx</b>	Glutathiona peroxidase
<b>Hb</b>	Hemoglobinas
<b>HPA</b>	Hidrocarboneto policíclico aromático
<b>IA</b>	<i>Independent action</i>
<b>IC<sub>máx</sub></b>	Concentração máxima inibitória
<b>LEMV</b>	Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária
<b>LPO</b>	Peroxidação lipídica / conteúdo de hidroperóxidos
<b>OF</b>	Organofosforados

<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PNCD</b>	Programa Nacional de Controle da Dengue
<b>PTN</b>	Proteína total
<b>qPCR</b>	Reação da cadeia da polimerase quantitativa
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>TMBZ</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride hydrate
<b>UFPR</b>	Universidade Federal do Paraná
<b>UT</b>	Unidade tóxica
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
®	Marca registrada
<b>AgCl</b>	Cloreto de prata
<b>CaSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de cálcio
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	Cádmio
<b>cm</b>	Centímetros
<b>Cu</b>	Cobre
<b>CV</b>	Coeficiente de variação
<b>Fe</b>	Ferro
<b>g</b>	Gramas
<b>h</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HMDE</b>	Eletrodo de gota pendente de mercúrio
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de potássio
<b>L</b>	Litros
<b>log</b>	Logarítmo
<b>M</b>	Molar
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mmol</b>	Milimol
<b>Mn</b>	Manganês
<b>N</b>	Normal
<b>nº</b>	Número
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>nmol</b>	Nanomol

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>O<sub>2</sub><sup>-2</sup></b>	Peróxido
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxila
<b>OH<sup>-</sup></b>	Íon hidroxila
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>ppm</b>	Partes por milhão (mg L <sup>-1</sup> )
<b>psi</b>	Pressão
<b>s</b>	Segundos
<b>S</b>	Desvio Padrão
<b>S<sup>2</sup></b>	Variância
<b>U</b>	Unidade
<b>V</b>	Volts
<b>X</b>	Média
<b>x<sup>2</sup></b>	Qui-quadrado
<b>µg</b>	Microgramas
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µS/cm</b>	Unidade da condutividade
<b>Zn</b>	Zinco



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	XVI
LISTA DE QUADROS .....	XIX
LISTA DE SIGLAS .....	XX
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XXII
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	3
OBJETIVO GERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
POLUENTES .....	4
MISTURAS DE POLUENTES .....	10
<i>Chironomus sancticaroli</i> Strixino & Strixino, 1981 .....	12
BIOMARCADORES .....	14
FLUXOGRAMA DE TRABALHO .....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
MATERIAL BIOLÓGICO .....	22
CRIAÇÃO DE <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	22
AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	24
REAGENTES .....	26
FAIXA LETAL DOS POLUENTES PARA <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	26
EXPOSIÇÃO AOS POLUENTES.....	27
QUANTIFICAÇÃO ANALÍTICA DOS POLUENTES.....	29
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	32
BIOMARCADORES MOLECULARES .....	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
RESULTADOS .....	46
AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	46
QUANTIFICAÇÃO ANALÍTICA DOS POLUENTES.....	47

Malathion .....	48
Fenantreno .....	49
Cádmio .....	50
FAIXA LETAL DOS POLUENTES PARA <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	57
MORTALIDADE .....	57
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	62
Malathion .....	62
Fenantreno .....	67
Cádmio .....	72
Mistura de malathion e fenantreno .....	76
Mistura de cádmio e malathion .....	81
Mistura de cádmio e fenantreno .....	85
Mistura de cádmio, malathion e fenantreno .....	89
Comparação malathion / fenantreno / malathion + fenantreno .....	93
Comparação cádmio / malathion / cádmio + malathion .....	97
Comparação cádmio / fenantreno / cádmio + fenantreno .....	101
Comparação cádmio / malathion / fenantreno / cádmio+malathion+fenantreno .....	105
BIOMARCADORES MOLECULARES .....	109
Malathion .....	109
Fenantreno .....	110
Cádmio .....	111
Mistura de malathion e fenantreno .....	112
Mistura de cádmio e malathion .....	113
Mistura de cádmio e fenantreno .....	114
Mistura de cádmio, malathion e fenantreno .....	116
Comparação malathion / fenantreno / malathion + fenantreno .....	118
Comparação cádmio / malathion / cádmio + malathion .....	118
Comparação cádmio / fenantreno / cádmio + fenantreno .....	118
Comparação cádmio / malathion / fenantreno / cádmio+malathion+fenantreno .....	118
DISCUSSÃO .....	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	141
REFERÊNCIAS .....	143

## INTRODUÇÃO

Os invertebrados aquáticos, abundantes representantes da biota aquática, são organismos que realizam diversas funções ecológicas nos ecossistemas de água doce. São responsáveis pela ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica, auxiliando na purificação da água. Além disso, são fontes de alimento para vertebrados e outros invertebrados, transferindo a energia dos produtores primários para os maiores níveis da cadeia trófica (CHAGNON et al., 2014).

Poluentes representam uma das maiores ameaça a biodiversidade dos ambientes de água doce (GEIST, 2011; BEKETOV et al., 2013), uma vez que ecossistemas aquáticos no mundo inteiro estão contaminados com diversos tipos de substâncias químicas provenientes das mais diferentes fontes (BONMATIN et al., 2014). Alterações na abundância, fisiologia e história de vida dos invertebrados causadas por contaminantes afetam os ecossistemas aquáticos, impactando a estrutura e composição das comunidades, através da perda da diversidade funcional e dos serviços ao ecossistema que estes organismos promovem (CHAGNON et al., 2014).

Grande parte das substâncias químicas utilizadas não chega efetivamente no objetivo final de sua aplicação, como exemplo, dos agrotóxicos usados em agrossistemas, menos de 1% atinge os organismos alvo (SINGH et al., 2014). O consumo de diversos compostos químicos devido ao avanço das atividades humanas tem resultado em inexorável poluição ambiental e os ecossistemas aquáticos são os principais compartimentos que recebem toda essa carga de diferentes substâncias químicas, gerando um quadro de contaminação com misturas de poluentes (DIAMOND et al., 2015).

O principal desafio para a avaliação do risco ecológico está justamente em entender os efeitos que as diferentes interações entre as misturas de substâncias químicas estão ocasionando na biota aquática (CEDERGREEN et al., 2012). Nesse contexto, os agrotóxicos são o grupo químico mais bem estudado dentre os estudos ecotoxicológicos de misturas. Isso não se deve

apenas ao fato da presença dos agrotóxicos em misturas nas formulações químicas e na coocorrência dessas substâncias nas regiões agrícolas, mas principalmente pelo amplo conhecimento da fisiologia do modo de ação desses compostos, tornando-os candidatos ideais para testes de modelos de misturas e facilitando o entendimento de possíveis interações (CEDERGREEN, 2014).

Os efeitos de misturas, compostas por diferentes classes de poluentes, são mais complexos de serem estudados justamente por envolverem diversas vias metabólicas (BEYER et al., 2014). Portanto, estudos que envolvam misturas de compostos com diferentes mecanismos de ação devem ser estimulados, contribuindo com o conhecimento na área de ecotoxicologia de misturas e gerando informações relevantes acerca dos efeitos dessas misturas em importantes organismos da biota aquática, como os invertebrados aquáticos.

Organismos da família Chironomidae estão presentes em abundância nos ambientes aquáticos e são frequentemente utilizados como bioindicadores e como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos (PRINTES et al., 2011; MICHAILOVA et al., 2012; REBECHI et al., 2014).

Diferentes espécies de Chironomidae irão responder de maneiras particulares a uma mesma situação de exposição, indicando sensibilidades diferenciadas, como é o caso das espécies *Chironomus tentans* Fabricius, 1805 e *Chironomus riparius* Meigen, 1804, amplamente utilizadas como bioindicadoras nos EUA e Europa, respectivamente (WATTS; PASCOE, 2000). Embora o conhecimento das respostas de espécies bioindicadoras tropicais como *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981, estejam crescendo ainda são necessários mais estudos para essa região biogeográfica, tão rica em diversidade e frequentemente impactada com a poluição.

Portanto, na tentativa de ampliar o conhecimento sobre os efeitos de misturas, principalmente em invertebrados, este trabalho utilizou a espécie tropical *Chironomus sancticaroli* como modelo de exposição ao inseticida organofosforado malathion, ao hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno, ao metal cádmio e suas misturas binárias e terciária.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda, os efeitos bioquímicos e moleculares do malathion, fenantreno e cádmio de forma isoladas e após a co-exposição dos compostos em larvas da espécie bioindicadora *Chironomus sancticaroli*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações letais (CLs) 48h do inseticida malathion, do hidrocarboneto fenantreno e do metal cádmio para *Chironomus sancticaroli*
- Avaliar a toxicidade aguda de três concentrações de malathion, fenantreno, cádmio e suas misturas binárias e terciária em larvas de *Chironomus sancticaroli*
- Comparar e quantificar as concentrações biodisponíveis de malathion, fenantreno e cádmio com as concentrações nominais nos bioensaios de toxicidade aguda.
- Avaliar os biomarcadores bioquímicos, como as enzimas AChE, EST alfa, EST beta, GST, CAT, SOD, LPO e o conteúdo total de hemoglobina e os biomarcadores moleculares como a expressão gênica de hemoglobinas nas larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao malathion, fenantreno, cádmio e suas misturas binárias e terciária.
- Comparar os efeitos dos compostos individuais com os efeitos das misturas binárias e terciária nas larvas de *Chironomus sancticaroli*

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### POLUENTES

#### Malathion

O malathion, *O,O-dimethyl dithiophosphate of diethyl mercapto succinate* (Figura 1) é um inseticida organofosforado (OF) sintético que dependendo da sua formulação é classificado como altamente tóxico a saúde humana (classe toxicológica I) ou moderadamente tóxico a saúde humana (classe toxicológica III) (WHO, 2009). Entretanto, independentemente da formulação utilizada é considerado altamente tóxico para organismos aquáticos e ao meio ambiente (ADAPAR, 2015).

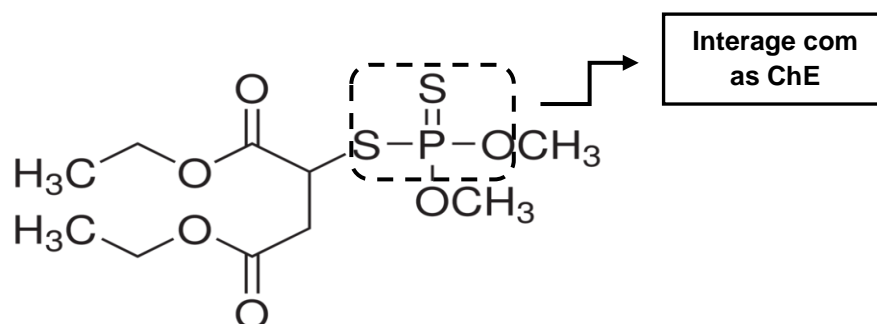


FIGURA 1: Estrutura química do inseticida malathion

O malathion atua inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE) através da sua ligação ao centro esterásico da AChE. Dessa forma, a enzima deixa de realizar sua função que é hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético nas fendas sinápticas (Figura 2). Assim, o neurotransmissor fica constantemente transmitindo impulsos nervosos, o que leva a hiperexcitação do sistema nervoso, podendo causar espasmos e morte (SINGH et al., 2014). Esta ligação é irreversível devido à alta afinidade química entre o composto e a enzima.

O malathion começou a ser produzido nos EUA em 1950 e desde então vem sendo utilizado no mundo inteiro. Sua aplicação é diversificada,

como no combate a insetos pragas em diversos agrossistemas, em produtos armazenados, em jardim de casas, no tratamento de pulgas em animais de estimação, piolhos em humanos e para combater os mosquitos transmissores dos agentes etiológicos da dengue e malária (ATSDR, 2003).

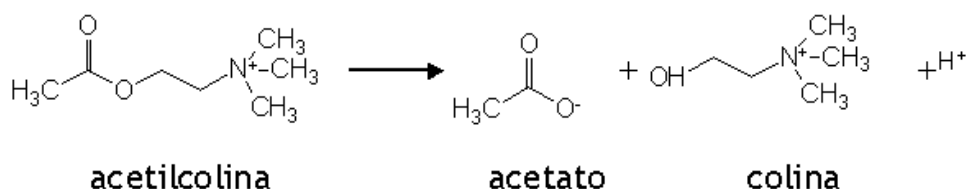


FIGURA 2: Reação de degradação da acetilcolina

No estado do Paraná, o uso do Malathion 400 EW está liberado para as culturas de citros, maçã, pêssago, repolho e tomate. O Malathion 500 EC está liberado para as culturas de citros para a praga *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) e tomate para as pragas *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) e *Neoleucinodes elegantalis* (Guennée 1854) (Lepidoptera: Crambridae). O Malathion 1000 EC está liberado apenas para a cultura do citros, com restrição apenas para a praga *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) (ADAPAR, 2015).

No Brasil, sua aplicação se estende também a programas de controle de vetores de patógenos, como o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Este programa foi implantado em 2002 com o objetivo de controlar e monitorar a resistência do mosquito transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 no país (FERREIRA et al., 2009).

Devido esta ampla utilização, uma grande porcentagem do inseticida aplicado acaba atingindo os ambientes aquáticos via escoamento, descargas de águas pluviais agrícolas e fluxo de retorno de campos irrigados (CAMPO et al., 2013). A Legislação Brasileira (resolução 357, de 17 de março de 2005, CONAMA) estabelece o valor máximo de 0,1 µg.L<sup>-1</sup> para o malathion em águas-doces de Classe 1 e 2 e 100 µg.L<sup>-1</sup> para águas-doces de Classe 3 e 4 (Quadro 1). Entretanto, concentrações acima do legalmente permitido podem

ser encontradas em ecossistemas aquáticos no território brasileiro (CAPOBIANGO; CARDEAL, 2005; NOGUEIRA et al., 2012).

No meio ambiente o destino do malathion e outros inseticidas organofosforados está associado com processos abióticos e bióticos, incluindo hidrólise, volatilização, foto oxidação, oxidação química e transformação microbiana (BEDUK et al., 2012). Seu metabólito primário é o malaoxon, o qual é 60 vezes mais tóxico, porém é um composto menos estável que o malathion, podendo ser rapidamente degradado em um metabólito não tóxico (SINGH et al., 2014). Esta conversão da forma **thion** para a **oxon** é realizada pelas monoxigenases e ambos compostos são responsáveis pela inibição da AChE (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

QUADRO 1: Classificação das águas-doces de Classe 1, 2, 3 e 4 segundo CONAMA (resolução 357, de 17 de março de 2005).

Classe 1 e 2 – águas destinadas:

- ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado;
- à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas;
- à recreação de contato primário;
- à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que são ingeridas sem remoção de película;
- à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

Classe 3 e 4 – águas destinadas:

- ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
- à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- à pesca amadora;
- à recreação de contato secundário;
- à dessedentação de animais.

## Fenantreno

O fenantreno é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) formado por três anéis de benzeno fundidos, compostos por átomos de carbono e hidrogênio (Figura 3) (MEIRE et al., 2007). Apresenta elevado ponto de fusão e ebulição, baixa pressão de vapor e pouca solubilidade em água (MAHANTY et al., 2011).

As fontes do fenantreno e de outros HPAs podem ser naturais, a partir de incêndios florestais, fossas de petróleo, vulcões, metabolismo de plantas



clorofiladas, fungos e bactérias, ou podem ser provenientes de atividades antropogênicas, como extração de petróleo, geração de energia elétrica, aquecimento doméstico, produção de carvão, asfalto e combustão de motores (GUPTA et al., 2015).

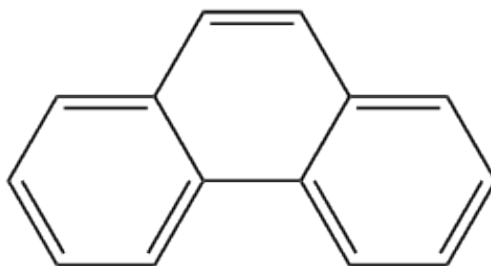


FIGURA 3: Estrutura química do hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno

Mais de 60% das emissões atmosféricas globais de HPAs são provenientes da queima de resíduos agrícolas/lenha e os três HPAs mais emitidos globalmente são o naftaleno, acenaftileno e fenantreno, representando 45, 17 e 10% das emissões, respectivamente. No Brasil, a principal fonte de emissão de HPAs são os incêndios florestais (SHEN et al., 2013).

Grandes quantidades de HPAs são extraídas, produzidas, refinadas e transportadas, portanto, a contaminação do meio ambiente ocorre frequentemente (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2011). Os níveis de HPAs encontrados em alimentos produzidos em áreas afastadas de centros urbanos e com atividades industriais refletem a contaminação ambiental pelos HPAs, que são transportados por longas distâncias através de partículas do ar (GUPTA et al., 2015).

Por ser um composto lipofílico, o fenantreno liga-se facilmente em sedimentos ricos em matéria orgânica, tornando-se menos disponível para subsequente degradação, o que confere alta persistência no meio ambiente (MAHANTY et al., 2011). Nos tecidos animais, o fenantreno pode acumular em células adiposas e desta forma ser transferido ao longo da cadeia trófica, gerando efeitos negativos em todos os organismos aos quais são expostos (ZHANG et al., 2015).

Os principais efeitos relacionados ao fenantreno são citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (MARTINS et al., 2013; MORAIS et al., 2014; SUARES-ROCHA et al., 2015). A carcinogenicidade dos HPAs é dependente de sua ativação metabólica, em três etapas metabólicas o hidrocarboneto biologicamente inativo pode se tornar um agente cancerígeno ativo. Essas três etapas compreendem a oxidação do anel aromático, catalisado pelo sistema do citocromo P450, a hidrólise do epóxido obtido e a subsequente oxidação de regiões específicas do produto anterior, formando diol-epóxido. Este composto final é capaz de se ligar covalentemente às moléculas de DNA e consequentemente causar mutações (BURCZYNSKI; PENNING, 2000; BRZUZAN et al., 2013).

Por ser nocivo ao homem e outros organismos, o fenantreno está entre os 16 HPAs classificados como prioritários para o monitoramento pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) (LIU et al., 2015). No Brasil, a legislação não estabelece um valor máximo do fenantreno para as águas-doces. Os únicos HPAs presentes na resolução brasileira são o benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno, todos com valores máximos permitido de  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  para as águas-doce de Classe 1. Já para as águas-doce de Classe 3 apenas o benzo[a]pireno encontra-se na legislação, apresentando valor máximo de  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (resolução 357, de 17 de março de 2005, CONAMA). Esses quatro HPAs presentes na legislação brasileira apresentam mais de três anéis aromáticos na sua composição química, portanto, apresentam características físico-químicas diferenciadas do fenantreno, sendo considerados mais tóxicos (MEIRE et al., 2007).

Embora caracterizado como persistente no meio ambiente, o fenantreno pode ser degradado através de processos químicos, como oxidação a partir do ozônio, peróxido de hidrogênio, permanganato e persulfato, ou através de processos biológicos sendo metabolizados por bactérias, fungos, algas e algumas plantas (MAHANTY et al., 2011).

## Cádmio

O cádmio,  $\text{Cd}^{2+}$ , é um metal de transição não essencial que pode ser encontrado naturalmente na crosta terrestre, principalmente em associação com o metal zinco ou com outros elementos, formando óxido de cádmio, cloreto de cádmio, sulfeto e sulfato de cádmio (ATSDR, 2012).

A produção anual de cádmio no mundo é de 22.000 toneladas, sendo a China o país com maior produção do metal (USGS, 2015). Este metal é amplamente utilizado na fabricação de tintas, pigmentos, peças galvanizadas, baterias, plásticos e borracha sintética (GUMPU et al., 2015). As atividades naturais como desgastes minerais, emissões vulcânicas e queimadas somadas as atividades antrópicas como mineração, fundição e refino de minérios de zinco constituem as principais fontes de entrada do cádmio no ambiente (CHEN; GRAEDEL, 2015; DIXIT et al., 2015).

A legislação brasileira estabelece o valor máximo de  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio total para as águas-doce de Classe 1 e 2 e o valor de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  para as águas-doce de Classe 3 e 4 (CONAMA, 2005). Entretanto, são relatadas concentrações superiores à permitida em diversos rios brasileiros (BARBOSA et al., 2010; CHIBA et al., 2011; WEBER et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2014; FRANZ et al., 2014).

Mesmo em baixas concentrações, o cádmio é considerado extremamente tóxico aos seres vivos (WANG; DU, 2013; CHEN; GRAEDEL, 2015). Pode bioacumular nos organismos, pois possui alta afinidade de ligação com metalotioneínas, dessa forma, pode ser transportado ao longo da cadeia alimentar (BÉCHARD et al., 2008). Uma vez no interior dos organismos pode apresentar grande estabilidade, o que dificulta a sua excreção, como por exemplo, nos seres humanos apresenta uma meia vida de 20-40 anos (MARETTOVÁ et al., 2015).

O cádmio é um composto carcinogênico que inibe as enzimas responsáveis por corrigir os erros no DNA e dessa forma, o erro celular é amplificado e as mutações nos genes ocorrem com mais frequência (GUMPU et al., 2015). O cádmio induz o estresse oxidativo através da (1) inibição de enzimas antioxidantes, (2) inibição da cadeia de transporte de elétrons, (3)

substituição do cobre (Cu) e do ferro (Fe) no citoplasma das células ou em proteínas de membranas, dessa forma, as concentrações de íons livres de  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+2}$  aumentam, levando a produção de radicais livres, através da reação de Fenton (Figura 4) (NAIR et al., 2013).

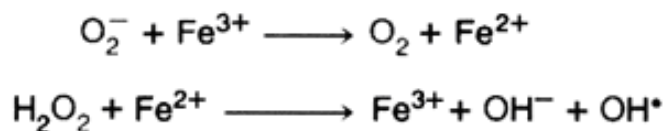


FIGURA 4: Reação de Fenton

As patologias normalmente encontradas nos seres humanos expostos ao cádmio são toxicidade renal, hipertensão, perda de peso, fadiga, anemia microcítica hipocrônica, linfocitose, fibrose pulmonar, aterosclerose, neuropatia periférica, osteomalacia, osteoporose e hiperuricemia (GUMPU et al., 2015). Em peixes o cádmio pode provocar diversas alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário (ZHANG et al., 2015), além de danos de peroxidação lipídica e no metabolismo de biodegradação. Já em invertebrados são observados efeitos no sistema imune (PEREZ; FONTANETTI, 2011), alteração de comportamento alimentar, locomotor e reprodutivo (MOGREN; TRUMBLE, 2010).

## MISTURAS DE POLUENTES

A poluição química é causada por um enorme número de substâncias emitidas a partir de diversas fontes e quantidades nas diferentes regiões do planeta. As substâncias químicas são distribuídas mundialmente devido a sua persistência, capacidade de transporte a longas distâncias, alta produção e uso generalizado em ampla gama de aplicações, gerando cenários de poluição com misturas de diversos tipos de compostos (DIAMOND et al., 2015).

A avaliação da toxicidade dos poluentes normalmente é feita individualmente, negligenciando efeitos potenciais da mistura, portanto, possivelmente os efeitos adversos das misturas de poluentes ambientais estão sendo subestimados (NØRGAARD; CEDERGREEN, 2010).

Um dos maiores desafios no estudo dos efeitos de misturas é que contaminantes com modo de ação semelhante ou diferentes podem influenciar a toxicidade de cada poluente, resultando em um número quase ilimitado de possíveis combinações de efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos (VIJVER et al., 2011; AMORIM et al., 2012; CHARLES et al., 2014; HOCHMUTH et al., 2014; WANG et al., 2015).

Devido ao grande número de contaminantes químicos e a complexidade dos sistemas naturais não é viável executar testes de toxicidade para cada mistura em potencial (BEYER et al., 2014), portanto alguns modelos foram desenvolvidos para se estimar a toxicidade de misturas a partir dos efeitos individuais de cada poluente (BELDEN et al., 2007).

Dois conceitos são amplamente utilizados, *concentration addition* (adição de concentração - CA) e *independent action* (ação independente - IA). CA e IA são modelos baseados na premissa de que dois ou mais compostos químicos irão afetar o organismo como se fossem a soma de cada um individualmente, portanto o resultado da mistura é adição (CHRISTEN et al., 2014). No modelo CA o modo de ação dos poluentes é o mesmo, já no modelo IA o modo de ação dos poluentes é diferente (BEYER et al., 2014; CEDERGREEN, 2014).

Os conceitos CA e IA consideram que as substâncias químicas não irão interagir na mistura, entretanto, desvios destes dois modelos de referência, como efeitos maiores do que o esperado (sinergismo) ou efeitos menores do que o esperado (antagonismo) podem acontecer (HASENBEIN et al., 2015).

Esses estudos toxicológicos de misturas empregam razões, como as unidades tóxicas (UT), para gerar uma escala normalizada. Essas unidades tóxicas são definidas como a concentração de uma substância química em particular na mistura dividida pelo valor da resposta biológica em questão, por exemplo, a concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>). Portanto, a toxicidade de uma mistura pode ser expressa como a soma das UT de cada poluente na mistura:

$$UT_{\text{soma}} = \frac{Cw_1}{CL50_1} + \frac{Cw_2}{CL50_2} + \dots + \frac{Cw_i}{CL50_i}$$

Onde,  $Cw_i$  é a concentração de uma substância química na mistura e  $CL50_i$  é o valor da concentração letal 50 da substância química para os componentes químicos da mistura de 1 a  $i$ .

Nas situações em que a soma das UT é aproximadamente 1, a resposta da mistura é a mesma de cada composto individual (adição). Quando  $UT < 1$ , a resposta da mistura apresenta menor efeito que os compostos individuais (antagonismo) e quando  $UT > 1$ , a resposta da mistura apresenta maior efeito que os compostos individuais (sinergismo) (MCCARTY et al., 1992).

#### *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981

A espécie tropical *Chironomus sancticaroli* possui registros de distribuição na Argentina e Brasil (FONSECA; ROCHA, 2004). Pertence à ordem Diptera, Família Chironomidae e apresenta desenvolvimento holometábolo, os ovos são envolvidos por uma mucilagem formando uma massa ovígera tubular recurvada, quatro instares larvais, o estágio de pupa e os adultos (Figura 5) (STRIXINO; STRIXINO, 1982).

As fêmeas colocam as massas ovígeras contendo de 500 a 1045 ovos no período da manhã ou no final da tarde. Durante a postura a fêmea permanece próxima da água, com a parte terminal do abdome ligeiramente recurvada para baixo e à medida que vai depositando os ovos executa movimentos laterais com o corpo. A massa ovígera fica conectada por um pedúnculo mucilaginoso na parede das bandejas de criação em laboratório ou em folhas na vegetação marginal de corpos d'água (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1989).

O período de incubação dos ovos é de 44 horas, em condições de temperatura entre 19 e 26°C. As larvas de I ínstar eclodem e permanecem no interior da matriz mucilaginosa por aproximadamente 12 horas, alimentando-se dessa mucilagem até seu esgotamento. A seguir, nadam ativamente, dispersando-se. Essas larvas de I ínstar são consideradas planctônicas, enquanto que as larvas de II, III e IV instares são bentônicas, construindo tubos a partir da aglutinação de detritos e sedimento (STRIXINO; STRIXINO, 1982).

À medida que as larvas vão crescendo a coloração muda de incolor no I ínstar, passando por vermelho claro no II ínstar e vai se intensificando até atingir o vermelho nas larvas de IV ínstar. Essa mudança se deve a produção do pigmento respiratório hemoglobina que vai aumentando ao longo do desenvolvimento larval (OH et al., 2014).

A duração de cada ínstar é de aproximadamente 3, 2, 4 e 14 dias, respectivamente, para o I, II, III e IV ínstar larval em temperatura de criação de 25°C (RICHARDI et al., 2013). O estágio de pupa tem duração de dois dias e os adultos apresentam tempo de vida efêmero de aproximadamente quatro dias. Portanto, nesta temperatura *C. sancticaroli* pode apresentar de 16 a 18 gerações ao ano (STRIXINO; STRIXINO, 1985).

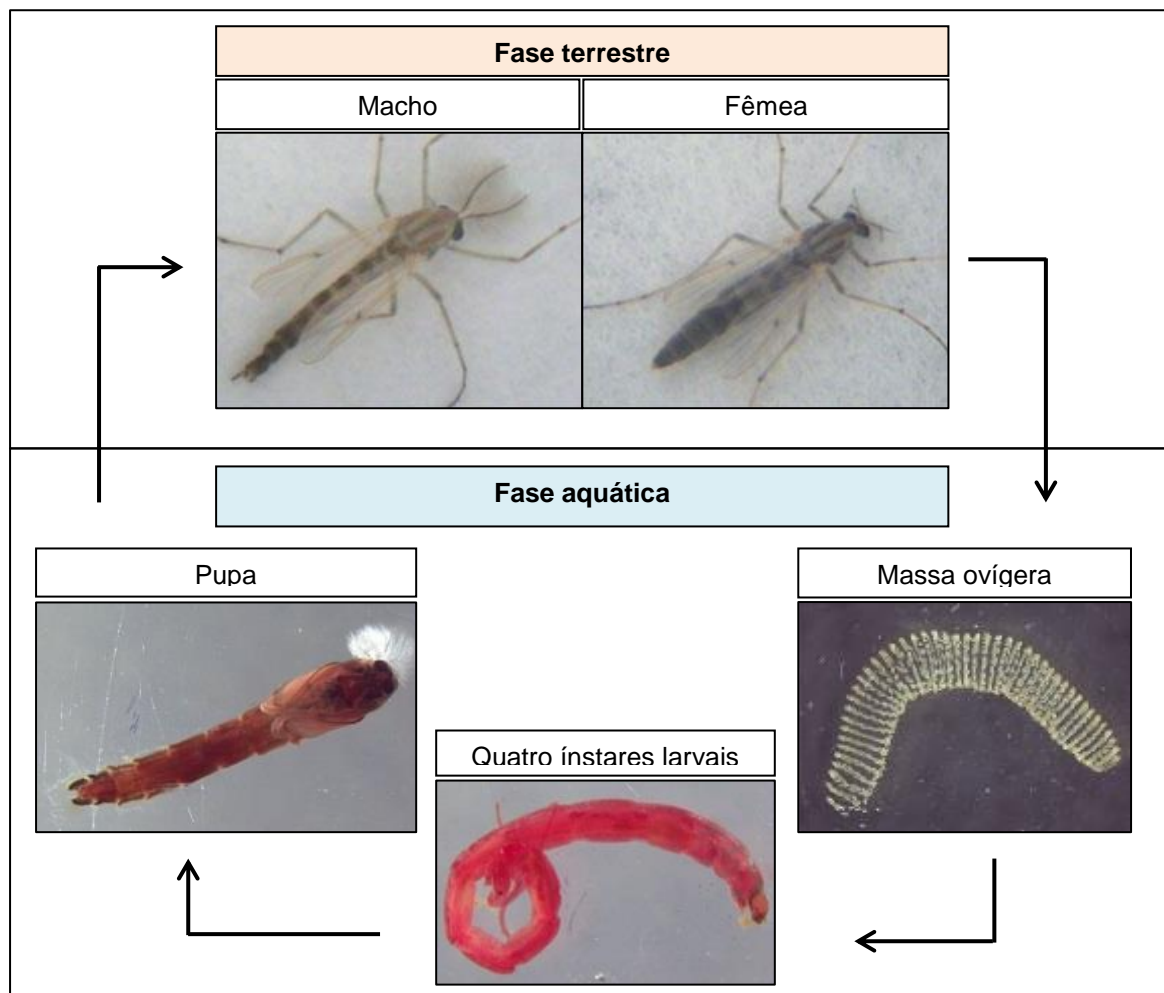


FIGURA 5: Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*

As três primeiras fases do ciclo de vida são aquáticas e os adultos são terrestres. Quando emergem, os machos e fêmeas não se alimentam, portanto, é na fase larval que os indivíduos armazenam toda a energia necessária para a reprodução e dependendo das condições tróficas em que as larvas são expostas a fecundidade dos adultos oscila, quanto mais alimentação maior a fecundidade (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1989).

Por serem abundantes organismos bentônicos com estreita relação com os sedimentos dos ambientes aquáticos são utilizados como bioindicadores de qualidade de água e sedimentos (PRINTES et al., 2007, 2011; MORAIS et al., 2014; REBECHI et al., 2014).

## BIOMARCADORES

Biomarcadores são alterações induzidas por contaminantes em componentes celulares, bioquímicos, processos, estruturas ou funções que são mensuráveis em um sistema biológico. Podem indicar os efeitos negativos dos poluentes na biota aquática antes que os efeitos deletérios sejam visíveis na comunidade aquática, dessa forma, medidas de conservação podem ser realizadas com antecedência, restaurando os ambientes antes que estejam degradados de forma irreversível (BENCIC, 2015).

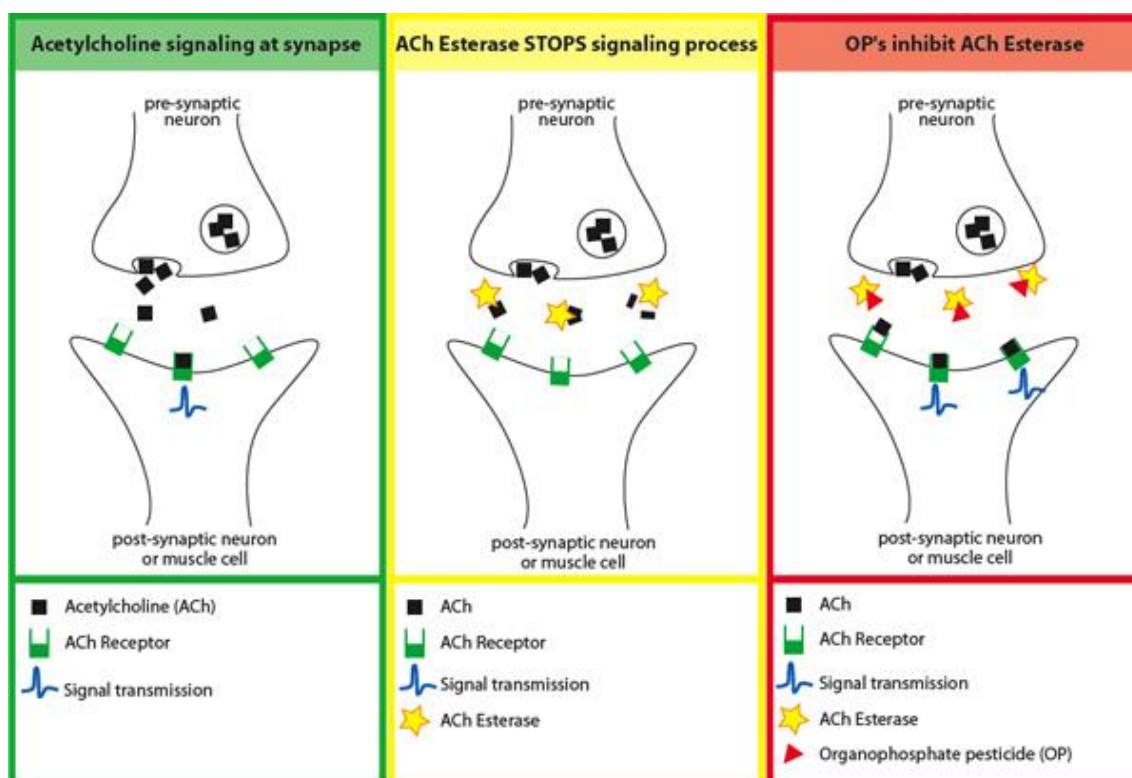
### Biomarcadores bioquímicos

#### Neurotoxicidade - Acetilcolinesterase (AChE)

As acetilcolinesterases são enzimas importantes encontradas nos tecidos nervosos e são altamente específicas ao neurotransmissor acetilcolina. As AChEs removem o neurotransmissor acetilcolina das fendas sinápticas, portanto regulam a transmissão do impulso nervoso (LANG et al., 2012). A inibição da AChE no sistema nervoso resulta na acumulação de acetilcolina, o que proporciona um maior tempo de permanência do neurotransmissor no seu receptor colinérgico, podendo levar a hiperexcitação e morte (Figura 6) (FULTON; KEY, 2001; PANG et al., 2012).



Diversos são os registros que indicam os compostos organofosforados como inibidores diretos dessa enzima (FULTON; KEY, 2001; GALLOWAY; HANDY, 2003; PRINTES et al., 2011; REBECHI et al., 2014). Recentemente foi mostrado que outros poluentes, como o metal cádmio, também podem reduzir a atividade da AChE (DEL PINO et al., 2014; WU et al., 2014; HAIDER et al., 2015).



Fonte: *Pediatric environmental health specialty (PEHSU)*, 2007.

FIGURA 6: Representação do funcionamento do sistema nervoso em condições normais (quadro verde e amarelo) e em condição alterada (quadro vermelho)

Biotransformação - Esterase alfa (EST- $\alpha$ ), Esterase beta (EST- $\beta$ ) e Glutathione S-transferase (GST)

Quando o organismo entra em contato com um poluente químico geralmente ocorrem reações de biotransformação de Fase I e II, objetivando o metabolismo desses compostos exógenos o mais rápido possível, gerando compostos mais lipossolúveis e de fácil excreção. As reações de Fase I são de oxidação, redução ou hidrólise, e as reações de Fase II envolvem a

conjugação. Os produtos desses processos são frequentemente mais reativos ou mais tóxicos que os iniciais, porém são mais instáveis e facilmente excretados (OOST et al., 2003; GONZÁLEZ; GUERRA, 2014).

As esterases alfa e beta são consideradas eficientes enzimas da Fase I do metabolismo que se ligam aos poluentes, transformando-os. Dessa forma, elas sequestram as substâncias exógenas rapidamente e vão metabolizando-as lentamente (CACCIATORE et al., 2013). Nos insetos, estão envolvidas em importantes processos fisiológicos, incluindo o catabolismo do hormônio juvenil, desenvolvimento ontogenético, digestão, reprodução e resistência a inseticidas (PALAKSHA; SHAKUNTHALA, 2015).

A glutathione S-transferase (GST) pertence a uma família de enzimas responsáveis por diversas funções fisiológicas, como transporte intracelular, biossíntese de hormônios, proteção contra estresse oxidativo e desintoxicação de compostos endógenos e poluentes. Participam do metabolismo de Fase II catalisando a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com compostos que possuem centros eletrofílicos (Figura 7). Os produtos dessa conjugação geralmente tornam-se menos tóxicos e mais solúveis em água, sendo mais facilmente excretados das células (SHI et al., 2012).

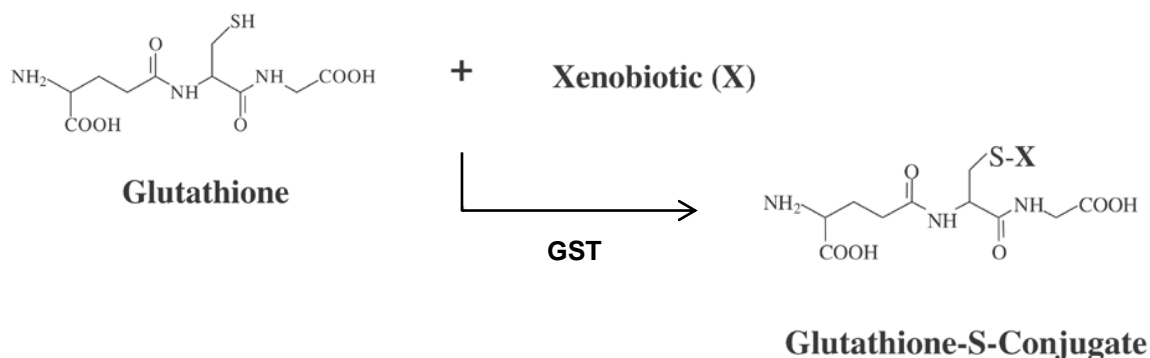


FIGURA 7: Reação de conjugação realizada pela glutathione S-transferase (GST)

**Estresse Oxidativo** - Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Peroxidação lipídica (LPO)

Em meios biológicos a maioria das moléculas e átomos se encontra estável por meio de ligações covalentes. Porém a clivagem hemolítica dessas

ligações pode gerar os chamados radicais livres ou espécies reativas, as quais apresentam um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa (LUSHCHAK, 2014).

As espécies reativas são produzidas normalmente pelas células durante processos metabólicos, entretanto sob condições normais o organismo possui enzimas protetoras, ou antioxidantes, que reparam 99% dos danos causados pela oxidação (WANG et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas por meio de sucessivas reações que reduzem o oxigênio à água. Como exemplos dessas ERO estão o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), ion hidroxila ( $OH^-$ ), o peróxido ( $O_2^{-2}$ ) e o próprio oxigênio ( $O_2$ ) (Figura 8).

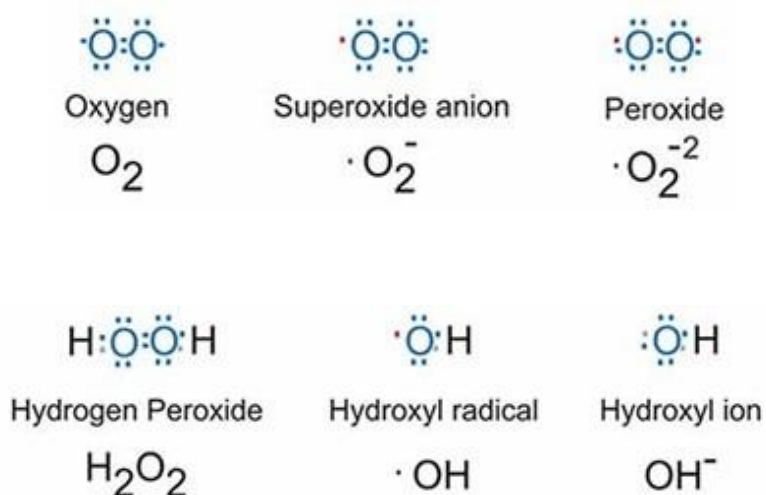
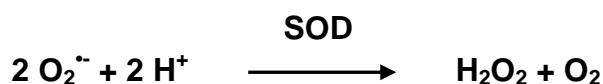


FIGURA 8: Nome, fórmula molecular e fórmula eletrônica das ERO

Quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a remoção delas pelos sistemas de defesa antioxidantes consideramos que o organismo está submetido a um estresse oxidativo (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Esta condição celular ou fisiológica se caracteriza por uma elevada quantidade de ERO, as quais reagem com biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podendo causar injúrias em estruturas celulares, inativação enzimática, danos ao DNA, peroxidação lipídica (LPO) e morte celular (IMLAY, 2003)

Os sistemas de defesa antioxidantes incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione dissulfeto redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, dentre outras. Essas enzimas e substâncias têm como função evitar as injúrias que podem ser causadas por muitos contaminantes ambientais, relatados por induzirem o estresse oxidativo, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e os metais (OOST et al., 2003).

Superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima essencial ao sistema de defesa antioxidante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formando peróxido de hidrogênio, de acordo com a reação:



Existem três formas conhecidas de SOD, a Cu/Zn-SOD, presente no citoplasma de eucariontes, a Mn-SOD, presente em bactérias e mitocôndrias e a Fe-SOD, presente apenas em bactérias (PARK et al., 2012).

Embora o peróxido de hidrogênio não seja tão reativo quanto o ânion superóxido, é um agente oxidante nocivo aos componentes celulares. A Catalase (CAT), também uma enzima antioxidante, realiza exclusivamente a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2008), segundo a reação:

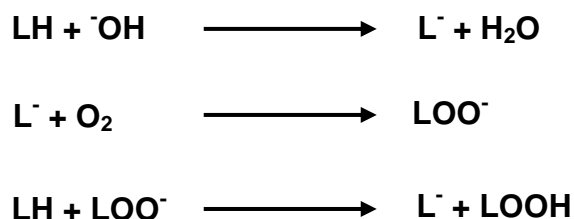


A atividade da catalase está relacionada com os peroxissomos, pequenos corpos que estão associados ao metabolismo de ácidos graxos. O  $H_2O_2$  produzido durante a oxidação do ácido graxo peroxissomal é degradado pela CAT a fim de evitar a formação de radicais  $OH^{\cdot}$  que podem vir a causar danos às membranas (TAN et al., 2014).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio, sendo as

membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. As consequências mais comuns da lipoperoxidação correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, dentre elas está o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e o gradiente de íons e metabólitos. Além disso, ocorre perda de integridade da membrana celular, o que pode tornar o ambiente mais favorável ao ataque do DNA (HIGUCHI, 2003).

A lipoperoxidação pode ser utilizada como um sinal de estresse oxidativo celular e ocorre em uma sequência de reações já conhecida. No passo inicial, um átomo de hidrogênio é sequestrado do ácido graxo contendo ao menos duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), radical livre centrado no carbono (radical lipídico) ( $L^{\cdot}$ ) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos). Seguido pela interação do  $L^{\cdot}$  com o oxigênio molecular ( $O_2$ ), para formar um radical peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ), que pode então retirar um átomo de hidrogênio tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio, como, por exemplo, um antioxidante. Em ambas as circunstâncias, um hidroperóxido de ácido graxo ( $LOOH$ ) é formado (GIROTTI, 2002), como mostram as reações:



### Biomarcadores moleculares

#### Expressão gênica de hemoglobinas

Apesar de o pigmento respiratório hemoglobina ser amplamente encontrado em todo o reino animal, a sua ocorrência em invertebrados é restrita apenas a alguns representantes dos grupos taxonômicos Insecta, Crustacea, Oligochaeta e Molusca (FIGUEIREDO et al., 1973; FLORES-TENA; MARTÍNEZ-TABCHET, 2001; HA; CHOI, 2008). Estudos sobre os

biomarcadores de poluição, os quais são aplicados parâmetros relacionados com a hemoglobina, recentemente estão se expandindo para incluir espécies de invertebrados (LEE et al., 2006; RIDER; LEBLANC, 2006; HA; CHOI, 2008b; LEE; CHOI, 2009).

Em Chironomidae as hemoglobinas apresentam heterogeneidade funcional e, diferentemente do que é encontrado para os vertebrados, não são responsáveis apenas pelo transporte e estocagem de oxigênio e dióxido de carbono, mas apresentam também a função de peroxidases, auxiliando o organismo a combater as ERO (SHOBANOV, 2004).

Considerando a ampla aplicação das larvas das espécies de *Chironomus* para o biomonitoramento e as particularidades fisiológicas da hemoglobina desses insetos, esse pigmento respiratório tem um considerável potencial como biomarcador sensível para o monitoramento ambiental (HA; CHOI, 2008a).

Poluentes podem alterar o perfil da expressão gênica nos organismos. A PCR quantitativa (qPCR) é uma das técnicas amplamente difundida para estudos genômicos e a realização da expressão gênica de diversos marcadores em organismos expostos à poluentes é uma abordagem que vem crescendo nos estudos ecotoxicológicos (KIM et al., 2015).

Diversos são os estudos envolvendo a expressão gênica de enzimas importantes, como glutathione S-transferase (NAIR; CHOI, 2011), superóxido dismutase (PARK et al., 2012), catalase (NAIR et al., 2011), HSPs (LEE et al., 2006), citocromo P450 (MARTÍNEZ-PAZ et al., 2012). Essas enzimas são importantes marcadoras de efeitos nocivos aos organismos e o perfil da expressão gênica é importante para elucidarmos alterações no nível transcricional.

## FLUXOGRAMA DE TRABALHO

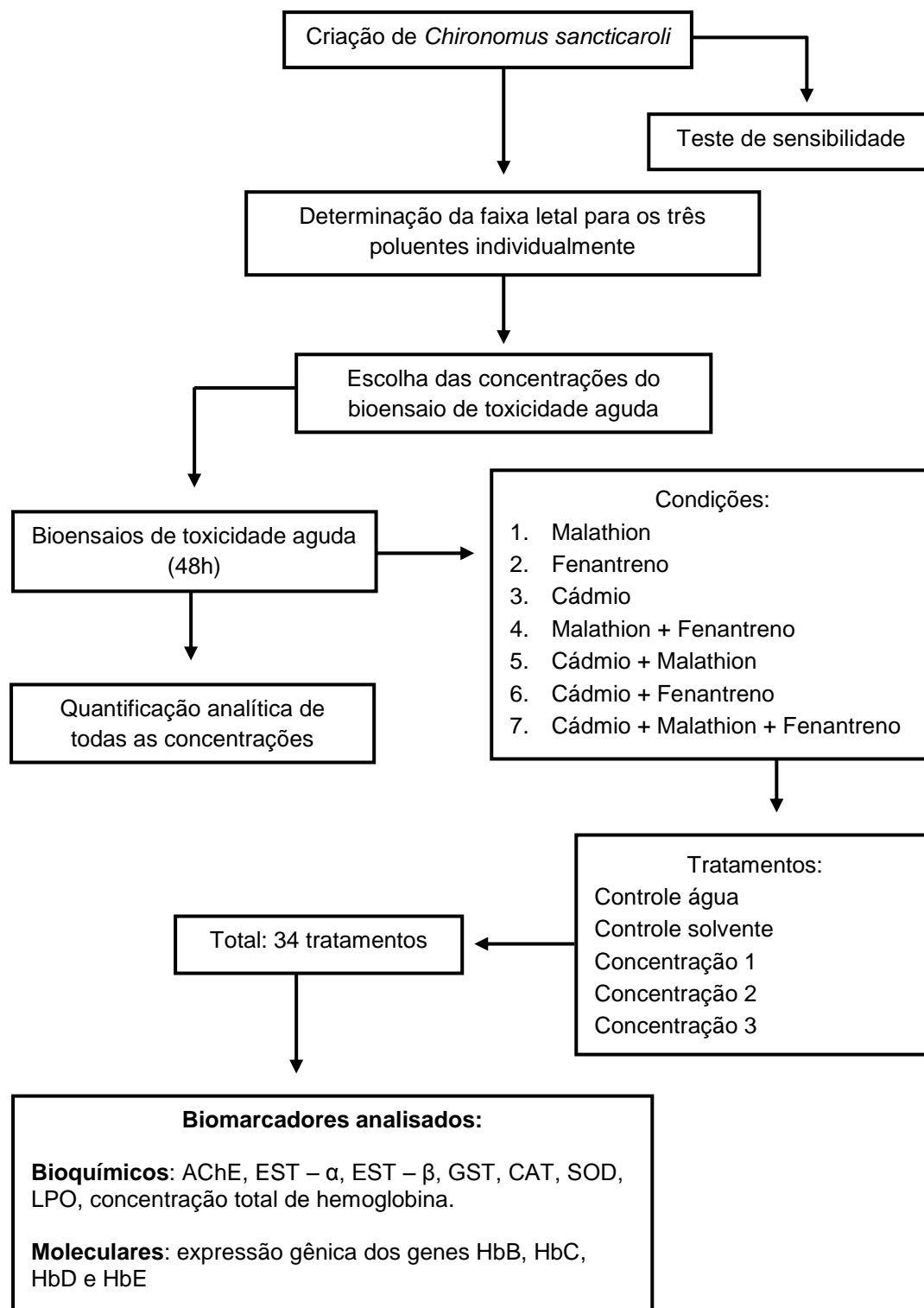


FIGURA 9: Fluxograma indicativo das atividades realizadas

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado foi proveniente de uma colônia matriz da espécie *Chironomus sancticaroli* pertencente ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV). Esta colônia é mantida desde fevereiro de 2008 em sala de criação do Programa de Pós-graduação em Entomologia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob condições controladas de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $80 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro).

Espécimes desta colônia foram depositados na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP), números de patrimônio 249269 a 249276.

### CRIAÇÃO DE *Chironomus sancticaroli*

A criação de *Chironomus sancticaroli* foi adaptada de Maier *et al.* (1990). Os organismos foram mantidos em quatro aquários de vidro (dimensões: 25 cm x 15 cm x 25 cm), com capacidade para 10 L (Figura 10). Os aquários possuem 2 cm de areia de rio autoclavada como sedimento, 7 litros de água reconstituída e aeração constante.

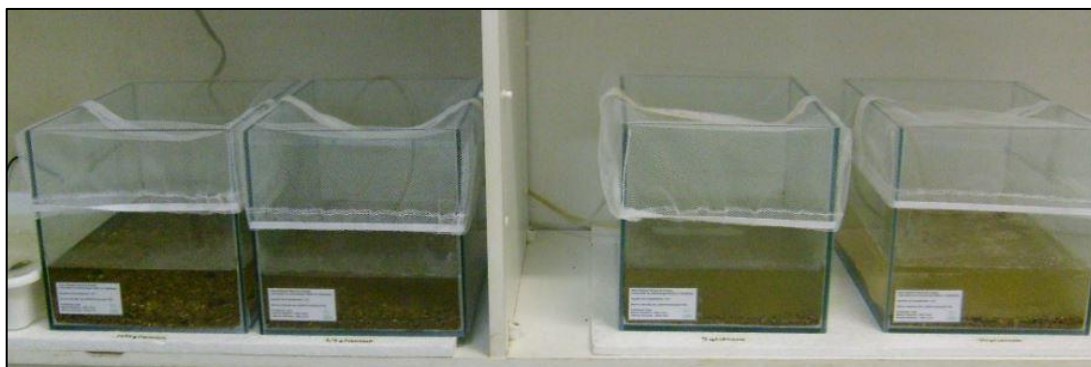


FIGURA 10: Aquários utilizados para a criação da espécie *Chironomus sancticaroli*



A água reconstituída utilizada foi preparada a partir de duas soluções estoque. A solução estoque 1 é de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a  $8,7 \mu\text{M}$  e a solução estoque 2 é composta por: cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ) a  $2,7 \mu\text{M}$ ; bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a  $57 \mu\text{M}$  e sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a  $24,7 \mu\text{M}$ . Para preparar 1 litro de água reconstituída foram acrescentados 8 ml da solução 1 e 4 ml da solução 2 em 988 ml de água destilada. Essas proporções foram adequadas para a produção de água reconstituída nos seguintes parâmetros: dureza de  $16 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH entre 7,2 e 7,6; condutividade de  $160 \mu\text{S/cm}$ .

Semanalmente eram acrescentados 8,58 g de ração triturada Dog Chow® e realizada a limpeza e troca parcial da água de dois aquários. Este procedimento segue uma ordem, a qual não era alterada, para que cada aquário fosse limpo duas vezes por mês, não interferindo no ciclo de vida dos organismos. Nos dias de limpeza foram mensurados os seguintes parâmetros da água dos aquários para controle da qualidade: condutividade, sólidos totais, salinidade, pH e temperatura.

Os aquários apresentavam espaço suficiente para a emergência dos adultos e foram cobertos com uma tela de tecido transparente, com um zíper no centro, o qual facilita a alimentação sem que ocorra a fuga dos adultos. Após a cópula, as fêmeas depositavam seus ovos diretamente na água do próprio aquário em que emergiram, portanto, nos aquários ocorriam simultaneamente todos os estágios de vida de *Chironomus sancticaroli*: ovos, larvas de I, II, III e IV ínstar, pupas, machos e fêmeas.

Para a realização dos bioensaios, massas ovígeras contendo aproximadamente 800 ovos foram retiradas dessa colônia matriz e individualizadas em bandejas de plástico (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm; com capacidade para 7 L), contendo 0,9 g de ração triturada TetraMin®, 4 litros de água reconstituída, 70 g de areia (quartzo branco -50+70 mesh da marca Sigma-Aldrich) e aeração constante, para o desenvolvimento das larvas, as quais foram selecionadas para os testes toxicológicos quando atingiam o IV ínstar inicial (7 dias) (Figura 11).

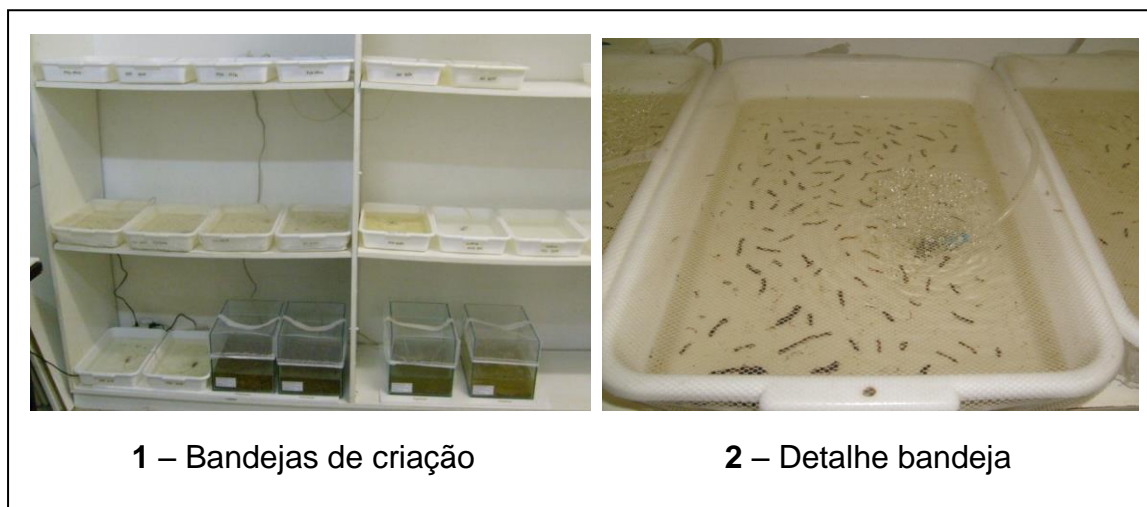


FIGURA 11: Sala de criação com imagens das bandejas utilizadas para a separação das larvas de *Chironomus sancticaroli* para realização dos bioensaios. 1 – Aspecto geral da disposição das bandejas na sala; 2 – Detalhe da bandeja (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm; com capacidade para 7 L) contendo larvas de IV ínstar inicial e aeração constante

#### AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Chironomus sancticaroli*

Testes de toxicidade com substância referência são aplicados para se obter informações relacionadas ao estado de saúde dos organismos usados nos testes. Além disso, demonstra se o laboratório pode realizar os procedimentos de ensaio de uma forma reprodutível e se a sensibilidade de uma determinada população em uso no laboratório é comparável a outras populações em outros laboratórios (OECD, 2000).

Recomenda-se a realização de testes com substância referência toda vez que novos organismos são introduzidos na colônia estoque ou toda vez que mudanças são realizadas na manutenção das colônias (OECD, 2011).

A substância de referência Cloreto de Potássio (KCl) é comumente utilizada para outras espécies de Chironomidae, como *Chironomus tentans* Fabricius, 1805 e *Chironomus riparius* Meigen, 1804 já padronizadas como organismo-teste por órgãos de defesa ambiental (USEPA, 2000; OECD, 2011). Por este motivo esta substância foi escolhida para ser aplicada nos testes de sensibilidade no presente trabalho.

Foram realizados 20 testes de sensibilidade para avaliação da qualidade da população de *Chironomus sancticaroli*, os quais consistiram em expor os

organismos-teste a diferentes concentrações da substância de referência KCl de acordo com o protocolo descrito por DORNFELD (2006) com modificações no tempo de experimento e alimentação dos organismos.

As concentrações de KCl utilizadas foram 1,5; 2,25; 3,5; 5,0; 7,5 g L<sup>-1</sup> e o grupo controle contendo água reconstituída. Para a realização desses testes utilizou-se 200 ml da solução de KCl, 500 µl de ração TetraMin® a 20g L<sup>-1</sup> apenas no primeiro dia de ensaio e seis organismos em cada uma das quatro réplicas realizadas por concentração, totalizando 144 larvas utilizadas por ensaio.

Os testes foram realizados em copos de vidro de 300 ml, tiveram duração de 48 horas e foram acondicionados em câmara tipo BOD programada para a temperatura de 25°C (± 1°C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). Os resultados foram analisados utilizando o programa Trimmed Spearman-Kärber, com a finalidade de se obter a CL<sub>50</sub> para o cloreto de potássio.

Para o estabelecimento da faixa de sensibilidade foram utilizados os valores médios da CL<sub>50</sub> obtidos, mais ou menos dois desvios padrão. Neste modelo, calcula-se a média (X), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Com estes dados estabelece-se o limite superior (X + 2.DP) e o inferior (X – 2.DP). Portanto, apenas os valores de CL<sub>50</sub> compreendidos dentro desta faixa são aproveitados, e conseqüentemente os que estão fora são descartados e os bioensaios realizados no mesmo período desconsiderados (USEPA, 2000).

A precisão analítica e variabilidade dos testes de sensibilidade foram avaliadas através do coeficiente de variação (CV), expresso de acordo com a fórmula:

$$CV = \frac{S}{X} . 100$$

onde:

S = desvio padrão

X = média

## REAGENTES

Para o desenvolvimento dos testes foram utilizados os reagentes: malathion pestanal (pureza > 96,1%, número CAS 121-75-5, Sigma-Aldrich catálogo nº 36143); fenantreno (pureza > 97,0%, número CAS 85-01-8, Sigma-Aldrich catálogo nº 77470) e cloreto de cádmio (pureza > 99,9%, número CAS 10325-94-7, Sigma-Aldrich catálogo nº 51994).

## FAIXA LETAL DOS POLUENTES PARA *Chironomus sancticaroli*

Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda com imaturos de *Chironomus sancticaroli* (IV ínstar inicial), com a finalidade de calcular a faixa de concentrações letais do malathion, fenantreno e cádmio para a população, isto é, as concentrações dos contaminantes que causam mortalidade de 0 a 99% dos organismos-teste.

Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro com capacidade de 300 ml, nos quais foram adicionados 100 ml da solução-teste. Foram utilizadas nove concentrações do malathion (0,019; 0,030; 0,046; 0,068; 0,102; 0,152; 0,228; 0,342 e 0,514 mg L<sup>-1</sup>), oito concentrações do fenantreno (0,40; 0,56; 0,79; 1,10; 1,54; 2,15; 3,01 e 4,21 mg L<sup>-1</sup>) e nove concentrações de cádmio (0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 25,6; 51,2 e 110 mg L<sup>-1</sup>), mais o controle contendo álcool absoluto para os experimentos de malathion e fenantreno e controle com água para os experimentos com cádmio.

Cada concentração contou com quatro réplicas, totalizando 40 frascos de vidro, os quais continham 13 g de areia como sedimento (areia de quartzo branco -50+70 mesh da marca Sigma-Aldrich) e dez larvas de *C. sancticaroli*, sendo utilizados 400 organismos por ensaio.

Foram realizados quatro bioensaios de cada contaminante para as determinações das concentrações letais, os quais tiveram duração de 48h e foram acondicionados em câmara tipo BOD programada para a temperatura de 25°C (± 1°C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro).

Os resultados dos quatro bioensaios de cada contaminante foram agrupados para serem analisados através do programa Probit Basic,

totalizando 1.600 larvas analisadas por composto (160 larvas por concentração).

## EXPOSIÇÃO AOS POLUENTES

Os bioensaios de toxicidade aguda (48h) com três concentrações do inseticida malathion, do hidrocarboneto fenantreno, do metal cádmio e suas misturas binárias e terciárias foram realizados expondo os organismos da espécie *Chironomus sancticaroli* aos compostos com a finalidade de analisar as respostas bioquímicas e moleculares geradas por essas exposições.

Para os bioensaios foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 ml, nos quais foram adicionados 100 ml da solução-teste e 13g de sedimento (areia de quartzo branco -50+70 mesh da marca Sigma-Aldrich) (Figura 12).

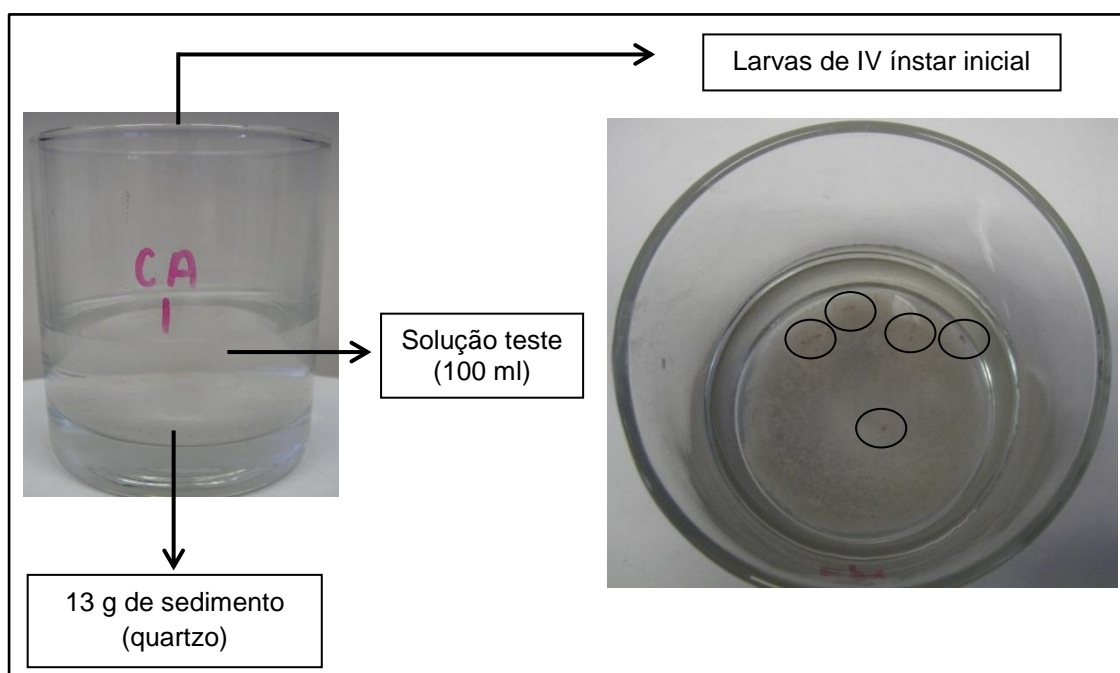


FIGURA 12: Representação esquemática dos recipientes dos bioensaios de toxicidade aguda. Recipiente de vidro com capacidade para 300 ml, contendo 100 ml de soluções teste e 13 g de sedimento. Os círculos pretos indicam o posicionamento de algumas larvas de *Chironomus sancticaroli* no interior do sedimento

Foram selecionadas três concentrações dos contaminantes mais os controles água e álcool absoluto. A primeira concentração escolhida representa

valor ambientalmente relevante para o composto fenantreno, já para o cádmio e malathion os valores representam o estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (resolução 357 do CONAMA) como limite para águas-doces de Classe 1 e 2. A segunda e a terceira concentrações representam respectivamente os valores calculados de CL<sub>25</sub> 48 h e CL<sub>50</sub> 48 h de cada poluente para a espécie *Chironomus sancticaroli* (Tabela 1).

TABELA 1: Concentrações utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda com malathion, fenantreno, cádmio e suas misturas binárias e terciárias em *Chironomus sancticaroli*. UT = Unidades tóxicas

Bioensaios	Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )		
	C1 = Conama	C2 = CL <sub>25</sub>	C3 = CL <sub>50</sub>
Malathion	0,0001	0,0564 (=0,5UT)	0,1006 (=1UT)
Fenantreno	0,0025	1,25 (=0,5UT)	2,44 (=1UT)
Cádmio	0,001	3,2 (=0,5UT)	7,4 (=1UT)
Malathion + Fenantreno	0,0001 + 0,0025	0,0564 + 1,25 (=1UT)	0,1006 + 2,44 (=2UT)
Cádmio + Malathion	0,001 + 0,0001	3,2 + 0,0564 (=1UT)	7,4 + 0,1006 (=2UT)
Cádmio + Fenantreno	0,001 + 0,0025	3,2 + 1,25 (=1UT)	7,4 + 2,44 (=2UT)
Cádmio + Malathion + Fenantreno	0,001 + 0,0001 + 0,0025	3,2 + 0,0564 + 1,25 (=1,5UT)	7,4 + 0,1006 + 2,44 (=3UT)

Os testes toxicológicos de misturas empregam uma razão não dimensional, as unidades tóxicas (UT), para gerar uma escala normalizada. Cada concentração de poluente é considerada como a fração de sua toxicidade individual, a qual normalmente é expressa em termos da sua CL<sub>50</sub>. A unidade tóxica total de uma mistura é a soma das frações individuais e esta abordagem assume previamente o efeito aditivo. Portanto, para os experimentos de mistura foram utilizadas as seguintes unidades tóxicas: 0,5; 1,0; 1,25; 2,0 e 3,0 UT (Tabela 1).

Foram realizadas 12 réplicas de cada concentração, totalizando 60 frascos de vidro, os quais continham dez larvas de *C. sancticaroli* do IV ínstar inicial, sendo utilizadas 600 larvas por ensaio. Três bioensaios foram realizados

para cada contaminante e suas combinações, totalizando 12.240 larvas utilizadas em todos os experimentos.

Os bioensaios tiveram duração de 48 horas e foram acondicionados em câmara tipo BOD programada com a temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). Após as 48 horas foram realizadas as leituras dos experimentos classificando as larvas em:

- Vivas (V): larvas com capacidade de natação igual as do controle.
- Predadas (P): larvas com cápsula cefálica e metade do corpo visível; resto do corpo consumido por outras larvas.
- Desaparecidas (D): larvas completamente desaparecidas (ex. apenas 9 indivíduos encontrados em um recipiente onde deveriam estar presente 10 indivíduos).
- Larvas vivas com espasmos musculares que afetam o comportamento de natação e construção de tubos de proteção (m).
- Mortas (M): larvas imóveis.

Somente as larvas consideradas vivas e vivas com alteração de comportamento (espasmos) foram individualizadas em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml devidamente identificados com o contaminante e a concentração a qual foram expostas e imediatamente congeladas em freezer -20°C e estocadas em freezer -80°C para posterior análise enzimática e molecular.

## QUANTIFICAÇÃO ANALÍTICA DOS POLUENTES

Para que se possa estabelecer a relação entre contaminantes ambientais e os efeitos biológicos encontrados nos organismos bioindicadores de toxicidade é necessário que as concentrações biodisponíveis sejam mensuradas através de técnica analítica adequada nos experimentos laboratoriais, uma vez que apenas as concentrações teóricas não representam fielmente as condições de exposição.

Em todas as exposições com os compostos malathion, cádmio, fenantreno e suas misturas binárias e terciárias foram retiradas alíquotas dos

experimentos para a quantificação das concentrações biodisponíveis dos poluentes.

Nos experimentos em que o malathion e o fenantreno estavam presentes foram retiradas alíquotas de 1 ml para todas as concentrações e controles, em triplicatas, nos tempos 0, 3, 21, 24, 27, 30, 45 e 48h, totalizando 720 alíquotas analisadas.

Para o cádmio foram retiradas alíquotas de 10 ml para os controles e concentração de  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  e alíquotas de 1ml para as concentrações de 3,2 e  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ . Essa diferença de volume está relacionada com a metodologia utilizada para as quantificações, para os controles e a concentração mais baixa são utilizadas as alíquotas puras e para as alíquotas mais concentradas é realizada uma diluição, portanto, menores volumes foram coletados. As alíquotas de cádmio foram retiradas em triplicatas, nos tempos 0, 24 e 48h, totalizando 171 alíquotas analisadas.

Todas as alíquotas foram filtradas com filtro de PTFE de  $0,45 \mu\text{m}$  para que nenhuma partícula de sedimento do experimento pudesse danificar os equipamentos de análise química. As alíquotas de malathion e fenantreno foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. As análises de cádmio começavam no mesmo dia da coleta e eram armazenadas em geladeira até a sua finalização, o que ocorria na mesma semana das coletas.

Previamente as quantificações foram realizados testes para se verificar se as amostras não iriam ficar retidas no filtro, portanto foram feitas quantificações com amostras testes filtradas e não filtradas e suas concentrações comparadas. Os filtros não modificaram as concentrações das amostras, então foi possível garantir que esse procedimento não iria interferir nas quantificações dos poluentes.

As quantificações de malathion e fenantreno foram realizadas no Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), localizado no departamento de Química da UFPR. Foi utilizada a espectrometria de massas, em equipamento Varian 320MS, com infusão direta de  $50 \mu\text{l}$  de cada alíquota em vazão constante de  $50 \mu\text{l/min}$ . A câmara foi mantida a  $45^{\circ}\text{C}$ , sob pressão de  $\text{N}_2$  40 psi e gás de secagem a  $200^{\circ}\text{C}$ . A voltagem na câmara foi de  $-4000\text{V}$  e detector em  $1200\text{V}$  (Figura 13). Curvas padrão foram elaboradas com padrão



de malathion com intervalo de concentração entre 0,1 a 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O padrão de fenantreno teve curva ajustada no intervalo entre 0,5 a 8000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



FIGURA 13: Espectrofotômetro de massas Varian 320MS utilizado para as determinações de malathion e fenantreno

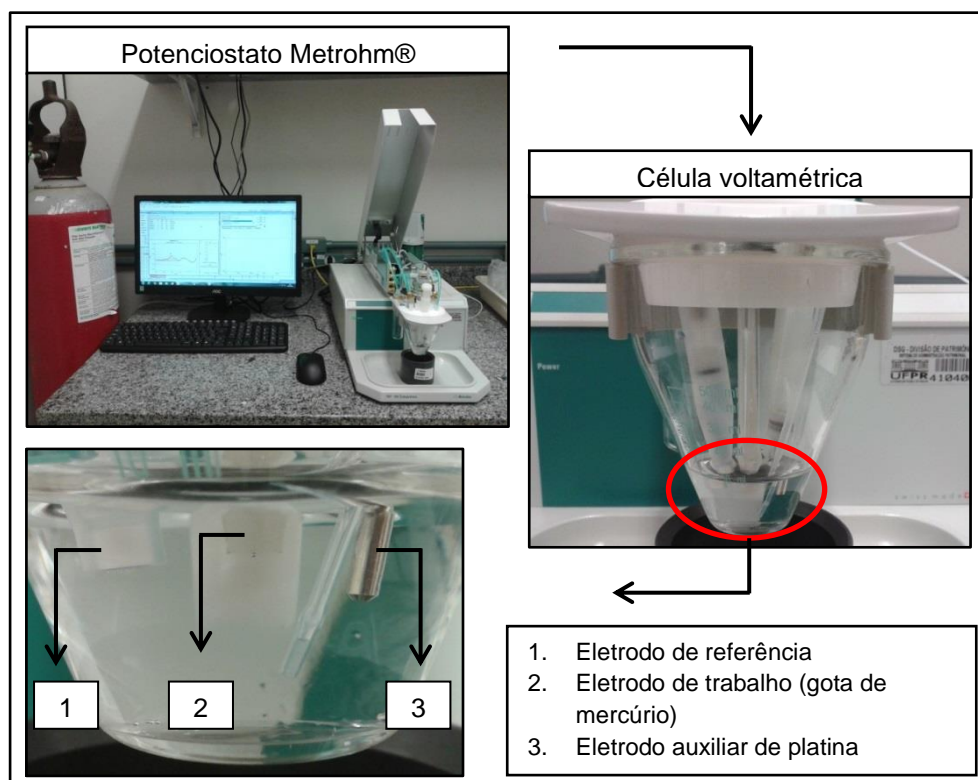


FIGURA 14: Potenciostato utilizado para as determinações de cádmio. Detalhe da célula voltamétrica e dos eletrodos utilizados

As quantificações de cádmio foram realizadas no Grupo de Química Ambiental, localizado no Departamento de Química da UFPR. Para tais determinações, foi utilizada a voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial, DPASV. As medidas foram realizadas em um potenciostato Metrohm®, modelo 797 VA Computrace. Foi utilizada uma solução de  $\text{Cd}^{2+}$  na concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada a partir da diluição de uma solução estoque de cádmio (Merck®). Como eletrólito de suporte foi utilizada uma solução de  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em célula voltamétrica com três eletrodos: de referência,  $\text{Ag/AgCl}_{(\text{s})}$ ; eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) como eletrodo de trabalho (Figura 14). Os parâmetros instrumentais utilizados para as determinações de cádmio estão na representados na tabela 2.

TABELA 2: Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de  $\text{Cd}^{2+}$  por voltametria de redissolução anódica (DPASV) de pulso diferencial

Parâmetros	$\text{Cd}^{2+}$
Potencial de deposição – $E_{\text{dep}}$ (V)	-1,0
Tempo de deposição – $t_d$ (s)	120 e 300
Tempo de equilíbrio – $t_e$ (s)	5,0
Potencial inicial – $E_i$ (V)	-1,0
Potencial final – $E_f$ (V)	0,0
Amplitude de pulso (V)	0,1
Tempo de pulso (s)	0,1
Velocidade de varredura ( $\text{Vs}^{-1}$ )	0,015

## BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

### Amostras

Cada amostra foi representada por um *pool* com 5 larvas. Para cada um dos 34 tratamentos foi realizada a quantificação enzimática de 20 *pools*, totalizando 680 *pools* e 3.400 larvas utilizadas. Os 34 tratamentos são referentes ao controle água, controle solvente e três concentrações das

exposições: malathion; fenantreno, cádmio (apenas controle água), malathion misturado com fenantreno, cádmio misturado com malathion; cádmio misturado com fenantreno e cádmio misturado com malathion e fenantreno.

### Homogeneização e alíquotas

Para a homogeneização do material, as larvas foram retiradas do congelador e foram colocados em mesa refrigerada a 4°C para descongelarem lentamente. Cada *pool* de 5 larvas foi colocado em novos microtubos de 1,5 ml e foi acrescentado 30 µl de água Milli-Q. As larvas foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador automático (microretífica Dremel®) e em seguida foram adicionados 590 µl de água Milli-Q em cada microtubo, totalizando um volume de homogeneização de 620 µl.

Os tubos foram centrifugados a 12000 x *g* por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e microplacas para a realização das alíquotas das amostras de acordo com o volume necessário para cada enzima. Nessas alíquotas foram considerados os volumes que seriam utilizados para as réplicas de cada enzima além de uma sobra para eventuais problemas de pipetagem. Por exemplo, para a enzima AChE são utilizados 25 µl de amostra para cada réplica (3 réplicas, total 75 µl) e para a enzima CAT são utilizados 5 µl de amostra para cada réplica (4 réplicas, total 20 µl). Portanto, o volume de amostra necessário para a realização dessas duas enzimas em um mesmo dia é de 95 µl, considerando eventuais perdas, foi aliquotado um volume de 125 µl (tabela 3). O mesmo se repete para as outras combinações de enzimas, que foram realizadas em um mesmo dia, evitando assim os ciclos de congelamento e descongelamento das amostras. Apenas para a enzima CAT foi utilizado 4 réplicas, para todas as outras enzimas foram utilizadas 3 réplicas e os volumes de amostras utilizados nas réplicas de cada enzima está descrito nas secções específicas de cada enzima. Do total de 620 µl homogeneizado, 475 µl foi utilizado para as quantificações enzimáticas e 145 µl foi estocado para eventuais repetições. As alíquotas foram congeladas no freezer -80°C até o dia da análise enzimática de cada enzima ou conjunto de enzimas.

TABELA 3: Volume das alíquotas utilizadas para cada enzima ou conjunto de enzimas e seu respectivo recipiente de armazenamento.

Enzima	Volume de amostra	Local
AChE + CAT	125µl	Microplaca
GST + PTN + EST $\alpha$ + EST $\beta$	180µl	Microplaca
SOD	80µl	2 tubos de microcentrifugação de 1,5ml com 40µl cada
LPO	70µl	Tubo de microcentrifugação de 1,5ml
Hemoglobina	20µl	Microplaca com total de 200µl (diluição 1:10)
Somatório	475µl	
Sobras para eventuais repetições	620µl – 475µl = 145µl	

#### Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Para análise da enzima AChE foi utilizado o método proposto por ELLMAN et al. (1961), modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS, 1998. O princípio do método é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre a colina e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) na presença da AChE, a qual degrada o ATC (iodeto de acetiltiocolina) em colina e ácido acético.

Uma alíquota de 25µl da amostra foi pipetada em três réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®) seguidos pela adição de 200 µl de DTNB 0,75 mM e 50 µl de ATC 10 mM e foram incubadas por 30 min. A leitura realizada foi do tipo cinética, a cada um minuto por cinco minutos em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em mmol/mg proteína/min (Figura 15A).

#### Atividade da esterase alfa (EST - $\alpha$ )

Para a análise da EST -  $\alpha$  foi utilizado o método proposto por VALLE *et al.* (2006). O método baseia-se no consumo do substrato alfa-naftil pela enzima esterase alfa, transformando-o em alfa-naftol, quando o corante Fast blue é acrescentado a reação é interrompida imediatamente e a quantidade do produto alfa-naftol pode ser medida através da coloração produzida.

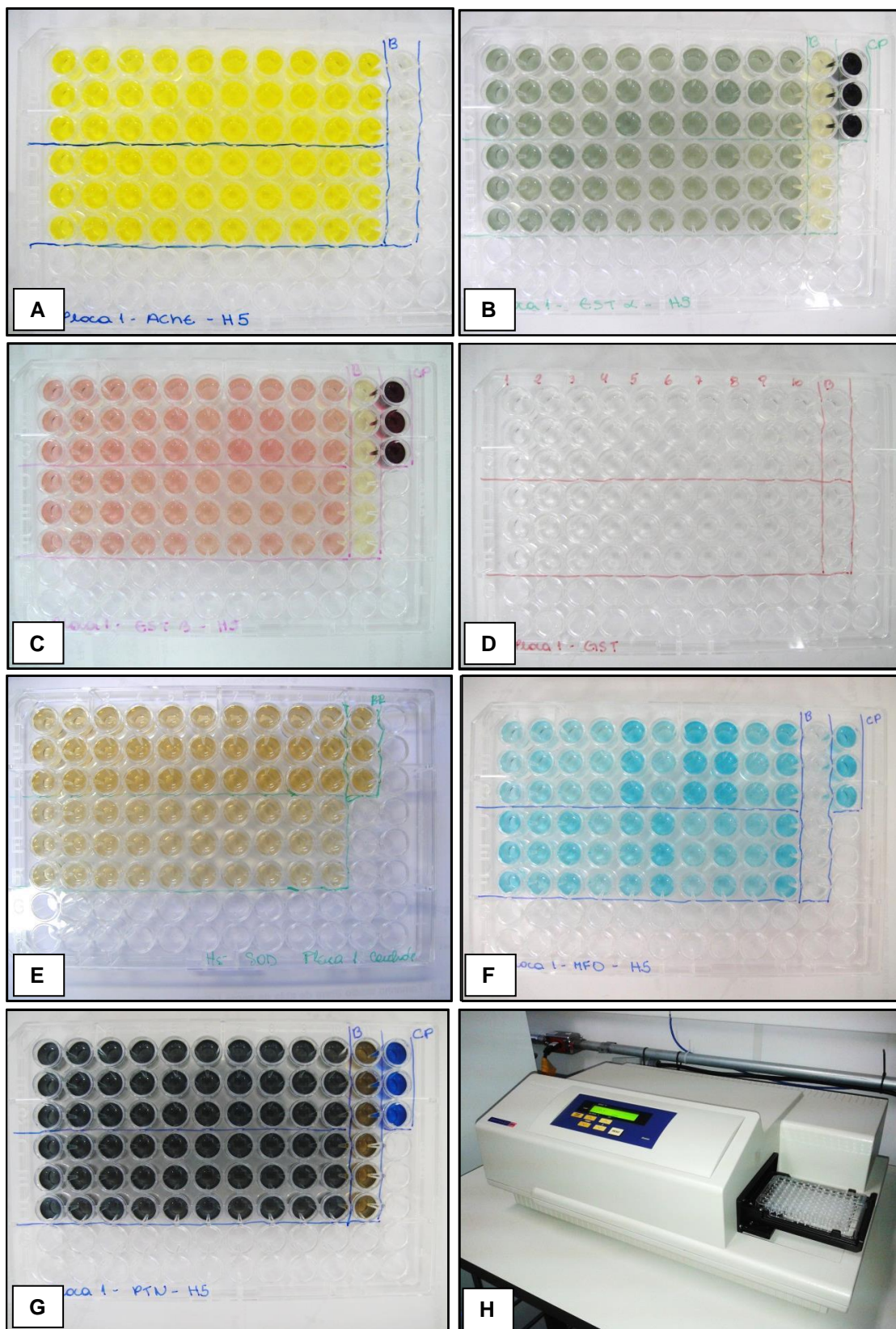


FIGURA 15: Imagem das microplacas do ensaio enzimático com as enzimas (A) acetilcolinesterase; (B) esterase alfa; (C) esterase beta; (D) glutathione S-transferase; (E) superóxido desmutase. Quantificações totais de (F) hemoglobinas e (G) proteínas. (H) Imagem do espectrofotômetro de microplacas SpectraMax 190



Uma alíquota de 10µl de amostra foi pipetada em três réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®), seguidos pela adição de 200 µl de alfa-naftil acetato/Na fosfato 0,3 mM. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, logo após adicionou-se 50 µl do corante Fast blue 0,3 %, então foram incubadas por mais cinco minutos. A leitura realizada foi do tipo *endpoint* em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 570 nm. Foi realizado um curva padrão com alfa naftol para a conversão dos valores de absorbância em conteúdo de alfa naftol (Figura 16A). Os resultados foram expressos em nmol de alfa naftol/mg proteína/min (Figura 15B).

#### Atividade da esterase beta (EST - $\beta$ )

Para a análise da EST -  $\beta$  foi utilizado o método proposto por VALLE *et al.* (2006). O método baseia-se no consumo do substrato beta-naftil pela enzima esterase beta, transformando-o em beta-naftol, quando o corante Fast blue é acrescentado a reação é interrompida imediatamente e a quantidade do produto beta-naftol pode ser medida através da coloração produzida.

Uma alíquota de 10µl de amostra foi pipetada em três réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®), seguidos pela adição de 200 µl de beta-naftil acetato/Na fosfato 0,3 mM. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, logo após adicionou-se 50 µl do corante Fast blue 0,3 %, então foram incubadas por mais cinco minutos.

A leitura realizada foi do tipo *endpoint* em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 570 nm. Foi realizado um curva padrão com beta naftol para a conversão dos valores de absorbância em conteúdo de beta naftol (Figura 16B). Os resultados foram expressos em nmol de beta naftol/mg proteína/min (Figura 15C).

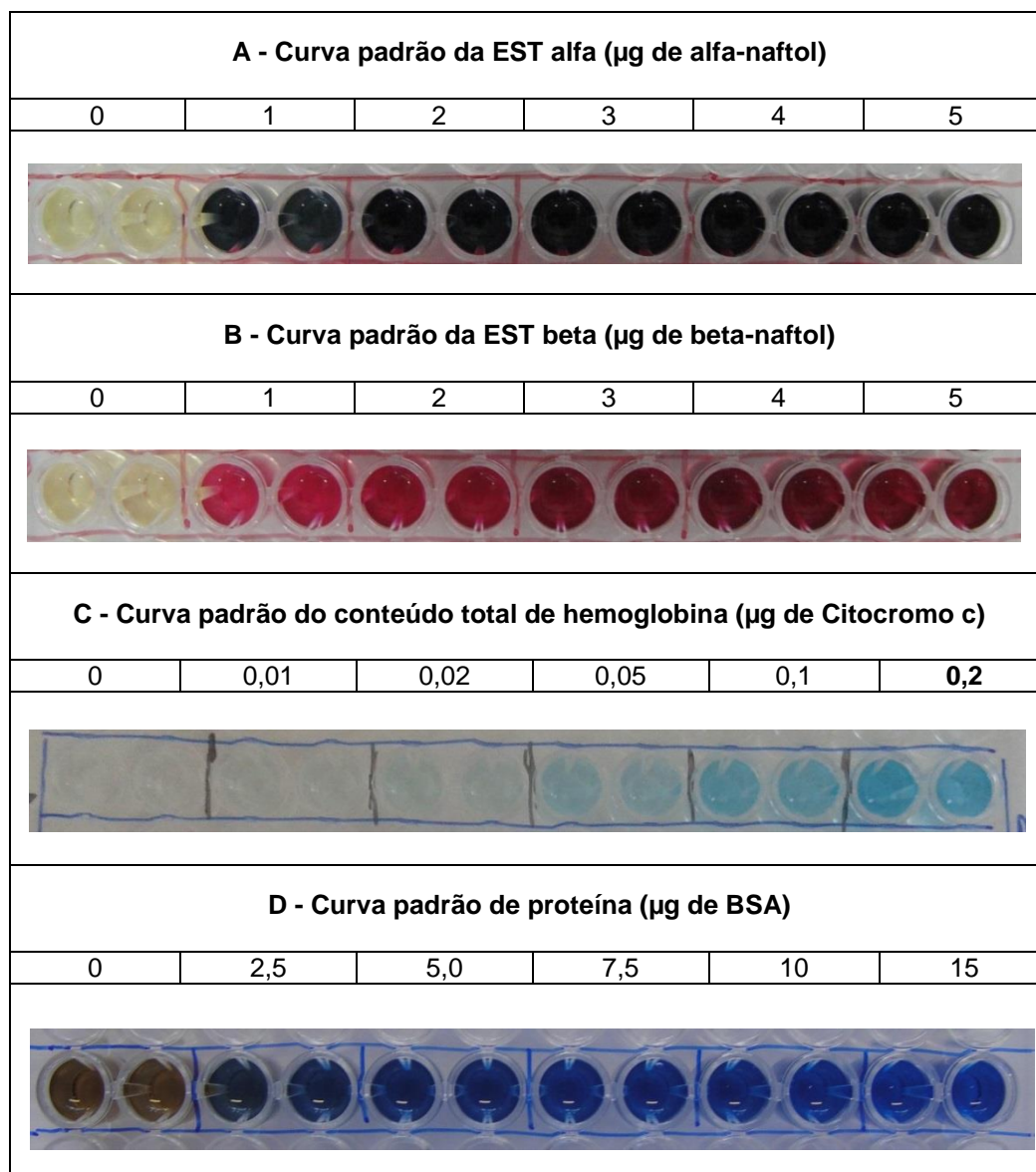


FIGURA 16: Curvas padrão do ensaio enzimático com as enzimas (A) esterase alfa; (B) esterase beta; (C) conteúdo total de hemoglobina; (D) proteínas

#### Atividade da glutathione S-Transferase (GST)

Para a análise da atividade da GST foi utilizado o método proposto por KEEN et al. (1976). As GSTs catalisam a reação de conjugação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathione reduzida), formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância através da leitura em espectrofotômetro.

Uma alíquota de 15 µl da amostra foi pipetada em três réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®), seguido pela adição de 195 µl da solução reação composta por CDNB 21 mM e GSH 10 mM. A leitura realizada foi do tipo cinética, a cada um minuto por 20 min em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína/min (Figura 15D).

#### Atividade da catalase (CAT)

Para a análise da atividade da CAT foi utilizado o método proposto por AEBI (1984) modificado. O princípio do método é o consumo de peróxido de hidrogênio exógeno através da atividade da catalase que gera oxigênio e água e é mensurado por espectrofotometria.

Uma alíquota de 5 µl da amostra foi pipetada em quatro réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, UV-star®, Greiner Bio-one®), seguido pela adição de 295 µl de solução reação a 80 mM composta por tampão Tris-base 1 M / EDTA 5 mM pH 8,0; peróxido de hidrogênio 30 % e água Milli-Q. A leitura realizada foi do tipo cinética, a cada 15 s por 5 min em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/mg proteína/min.

#### Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD foi utilizado o método proposto por GAO et al. (1998) que é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Em um microtubo do tipo eppendorf foram adicionados 885 µl de tampão (Tris-base 1M / EDTA 5 mM pH 8,0) a 40 µl de amostra. Após agitação em vórtex, 50 µl de pirogalol 20 mM foram adicionados e a solução foi incubada por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 µl de HCl 1N. Em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®) foram adicionados 300 µl por poço em três réplicas. A leitura realizada



foi do tipo *endpoint* em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 440 nm. Foi realizado concomitantemente, um controle por amostra com adição dos reagentes, mas sem incubação sendo este valor igual a 100%. A quantidade de SOD que inibiu a reação em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína (Figura 15E).

#### Peroxidação Lipídica (LPO)

A análise da LPO foi realizada seguindo o ensaio FOX, proposto por JIANG et al. (1992), o qual se baseia na avaliação da concentração de hidroperóxidos. O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido.

As amostras foram diluídas em metanol (1:1 v/v), centrifugadas a 5.000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante (100 µl) foi transferido para outro microtubo do tipo eppendorf ao qual foi adicionado 900 µl da solução reação contendo laranja de xilenol (0,1 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) e ácido sulfúrico (25 mM) diluídos em metanol. Após incubação de 30 min no escuro cada amostra foi pipetada em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®), 300 µl por poço em triplicata. A leitura realizada foi do tipo *endpoint* em espectrofotômetro de microplaca Sunrise (TECAN) com comprimento de onda de 570 nm. A unidade de concentração de peróxidos lipídicos usada foi nmol/mg de proteína.

#### Concentração de hemoglobinas totais (Hb)

A quantidade de hemoglobina total foi mensurada de acordo com o método de VALLE et al. (2006). No manual de VALLE et al. (2006) os autores desenvolveram um método para determinar a quantidade de grupamentos heme em *Aedes aegypti*, com a finalidade de quantificar indiretamente a atividade enzimática do citocromo P450, o qual apresenta grupamentos heme. No presente trabalho o mesmo protocolo foi utilizado, entretanto, com a

finalidade de se quantificar o conteúdo total de hemoglobinas, já que estas apresentam grupamentos heme em sua composição.

Uma alíquota de 20 µl de amostra já diluída em água Milli-Q na proporção de 1:10 foi pipetada em três réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®), seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 90 mM pH 7,2; TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride hydrate) 0,2% e peróxido de hidrogênio 3%. As placas foram incubadas por 90 min no escuro e então foi realizada a leitura do tipo *endpoint* em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 650 nm. Foi realizada uma curva padrão com citocromo c (contém grupamento heme) para a conversão dos valores de absorbância em conteúdo de citocromo c (Figura 16C). Os resultados foram expressos em nmol de citocromo c/mg proteína (Figura 15F).

#### Concentração de proteína total (PTN)

A quantidade de proteína total foi mensurada de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976), esta quantificação é necessária, pois os resultados de todas as enzimas são normalizados de acordo com a quantidade de proteína total presente em cada *pool* de amostra.

Uma alíquota de 10 µl de amostra foi pipetada em três réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato, Greiner Bio-one®), seguido pela adição de 250 µl do reativo Bradford (Bio-Rad) diluído em água Milli-Q na proporção de 1:5. A leitura realizada foi do tipo *endpoint* em espectrofotômetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) com comprimento de onda de 620 nm. (Figura 15G). Foi realizada uma curva padrão com soro de albumina bovina (BSA) (Figura 16D).

#### BIOMARCADORES MOLECULARES

Parte dos procedimentos relacionados à expressão gênica foi realizada no Brasil (extração de RNA, tratamento com DNase I e transcrição reversa) e a parte da qPCR era para ser realizada durante estágio sanduíche de 5 meses

sob supervisão do Prof. Dr. Richard E. Connon, Universidade da Califórnia Davis, UC Davis, Estados Unidos da América. Entretanto, as amostras enviadas aos EUA não estavam com boa qualidade, por isso, após retorno ao Brasil foi refeita a síntese de cDNA e a qPCR foi realizada utilizando-se equipamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da UFPR, sob responsabilidade da Prof. Dr. Maria Cristina Borba Braga.

## Amostras

Cada amostra foi representada por um *pool* com 10 larvas. Para cada um dos 28 tratamentos foi realizada a expressão gênica de 5 *pools*, totalizando 140 *pools* e 1.400 larvas utilizadas. Os 28 tratamentos são referentes ao controle solvente e três concentrações das exposições: malathion; fenantreno, cádmio (controle água no lugar do solvente), malathion misturado com fenantreno, cádmio misturado com malathion; cádmio misturado com fenantreno e cádmio misturado com malathion e fenantreno.

## Extração de RNA total

Para a extração do RNA total das larvas foi utilizado o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen®). As larvas provenientes dos bioensaios de toxicidade aguda foram retiradas do freezer -80°C e imediatamente distribuídas em *pools* de 10 larvas em microtubos de 2 ml com tampa tipo rosca (Kasvi catálogo nº K6-0202 e nº K6-0001) contendo 350 µl do tampão RLT de lise celular fornecido pelo kit de extração.

As larvas foram homogeneizadas com *beads* de óxido de zircônio (1,4 mm de diâmetro - Bioamérica® catálogo nº 03961-1-003.2) com o auxílio do homogeneizador Mynilys® por 90 s na velocidade média. Após a homogeneização seguiu-se exatamente o protocolo do kit de extração para a obtenção de 30 µl de RNA total de cada amostra. As concentrações de cada amostra foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® e um gel de agarose a 1% foi realizado para a verificação da qualidade do RNA (tempo de corrida 1h e 30 min a 100V).

## Tratamento com DNase

As amostras foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich catálogo nº AMPD1) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Foram tratados 8 µg de RNA de cada amostra. Para isso foi utilizado para cada amostra: 3 µl do buffer 10X, 3 µl de DNase I, 24 µl de RNA + água (volumes variáveis de acordo com cada amostra), incubou-se por 15 min a temperatura ambiente, logo após foi acrescentado 3 µl da solução de parada e incubou-se por 10 min a 70°C. As amostras foram colocadas no gelo para então a concentração de RNA ser quantificada novamente em espectrofotômetro NanoDrop®. Outro gel de agarose a 1% foi realizado para a verificação da qualidade do RNA (tempo de corrida 1h e 30 min a 100V).

## Transcrição reversa (cDNA)

Para a transcrição reversa de RNA para o DNA complementar (cDNA) foram utilizados 2 µg de RNA tratado com DNase I. A reação final apresentou um volume de 20 µl, sendo 10 µl de RNA + água (volumes variáveis de acordo com a amostra) e 10 µl dos seguintes reagentes: 4 µl do buffer 5X (acompanha a enzima SuperScript III); 1 µl de dNTP a 10 mM (Promega catálogo nº U1420); 2 µl do random primer a 300 ng/µl (Invitrogen® catálogo nº 48190-011); 1 µl de DTT a 0,1 M (acompanha a enzima SuperScript III); 0,25 µl de SuperScript III (Invitrogen® catálogo nº 18080-044); 0,25 µl de RNase OUT (Invitrogen® catálogo nº 10777-019) e 1,5 µl de água livre de nucleases.

As reações foram realizadas em placas de PCR de 96 poços (Kasvi catálogo nº K4-9615) e em termociclador BioRad® seguindo o seguinte protocolo: 50 min a 50°C e 5 min a 95°C. Após esta etapa as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

## qPCR

A reação da PCR quantitativa apresentou um volume final de 12 µl, sendo 5 µl de cDNA diluído em água livre de nucleases na proporção 1:5 e 7 µl

do master mix contendo: 6 µl de Sybr Green PCR master mix (Invitrogen® catálogo nº 4367659); 0,25 µl do primer forward a 10 µM (Eurofins®); 0,25 µl do primer reverse a 10 µM (Eurofins®) e 0,5 µl de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em placas de qPCR de 96 poços (Applied Biosystems catálogo nº 4346907), no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System seguindo o seguinte protocolo: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 30s, 72°C por 30s.

Os resultados foram visualizados e analisados no programa 7500 Fast software v.2.0.5. A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e esta foi normalizada utilizando um gene referência (actina). A estabilidade do gene referência entre os tratamentos foi inicialmente testada utilizando o programa GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002).

Foi realizado um teste para se calcular a eficiência dos primers, os quais precisam apresentar uma eficiência entre 90 e 110% para serem utilizados. Uma série de 6 diluições 1:10 cada foi realizada utilizando-se uma mesma amostra e procedeu-se exatamente como o descrito anteriormente para a realização da expressão gênica. Para cada diluição foi realizado três réplicas e a eficiência de cada primer foi então calculada (DERVEAUX et al., 2010).

TABELA 4: Sequências dos primers utilizados para expressão gênica da HbB, HbC, HbD, HbE e actina em *Chironomus sancticaroli*

Gene	Primer forward	Primer reverse	Tamanho fragmento
HbB	TGGGGCATTTGATTCGTTTCC	CGCTGGAAAGGATGTTGCTTC	116 pb
HbC	ACTGGGATTCCACGAGCTTT	TTCGCCACACATGCTGGAA	137 pb
HbD	CGAAAGCAGCTGTGTCCTTG	ATCCTTGCTGCCGTCTTCTC	122 pb
HbE	GCTGGGGCATTTGATTCGTT	TTCGCTGGAAAGGATGTTGC	114 pb
Actina	GAACAAGAAATGGCCACCGC	GAGTGATTCTGGGCAACGGA	104 pb

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

### Determinação das concentrações letais

Para se calcular as concentrações letais de cada contaminante para a população de *Chironomus sancticaroli*, os resultados de mortalidade dos quatro

bioensaios de toxicidade aguda de cada poluente foram agrupados (12 bioensaios no total, quatro com cada poluente). Uma regressão não linear foi realizada utilizando o programa *Probit basic*.

Os dados das curvas concentração-resposta de cada poluente foram utilizados para se calcular os possíveis efeitos das misturas desses compostos, sendo geradas curvas de previsão de acordo com os modelos de *concentration addition* (adição de concentração - CA) e *independent action* (ação independente - IA). Os cálculos para estas curvas de previsão seguiram o proposto por BACKHAUS et al. (2000). Os dados de mortalidade observados foram então comparados com as curvas de previsão calculadas.

#### Quantificação analítica dos poluentes

Para se verificar se existiam diferenças significativas entre os valores das concentrações biodisponíveis de malathion e fenantreno nos tempos 0, 3, 21, 24, 27, 30, 45 e 48h e de cádmio nos tempos de 0, 24 e 48h foi realizada uma análise de variância ANOVA – one way, seguida do pós-teste de Dunnett comparando o tempo 0h em relação aos outros tempos. A análise foi realizada no programa *GraphPad Prism 5®* com nível de significância de  $\alpha < 0,05$ .

#### Biomarcadores bioquímicos

A normalidade e homogeneidade dos resultados das atividades das enzimas AChE, EST alfa, EST beta, GST, CAT, SOD, LPO e o conteúdo total de hemoglobina foram analisados utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente, no programa PAST 3.0. Como os pressupostos estatísticos não foram validados, a análise não paramétrica Kruskal-Wallis foi realizada seguida pelo pós-teste de Dunnett. Os gráficos e a análise estatística foram realizados no programa *GraphPad Prism 5®* com nível de significância de  $p < 0,05$ .

Análise de componente principal (PCA) foi realizada com o programa estatístico Xlstat v. 7.5.2 na tentativa de se compreender as respostas de todas as enzimas entre os tratamentos expostos. Os dados utilizados para essa

análise foram os resultados das atividades enzimáticas de cada exposição normalizadas pela média do controle solvente da respectiva exposição. Os escores da PCA foram calculados utilizando matriz de covariância e os componentes principais 1, 2 e 3 foram determinados para explicar a maioria da variância dos dados, usando Scree Test (Scree plot) (D'AGOSTINO; RUSSEL, 2005). Os escores da PCA dos componentes 1, 2 e 3 foram plotados em um gráfico centroide para serem visualizados e interpretados. Além disso, os respectivos biplot foram plotados para se identificar quais enzimas direcionam os componentes e explicam a variância entre os tratamentos.

### Biomarcadores moleculares

As diferenças nos níveis de expressão gênica entre os tratamentos foram verificadas por meio da análise de variância ANOVA – one way, seguida pelo pós-teste de Tukey. Quando os pressupostos de homogeneidade e normalidade dos dados não foram validados, foi realizada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida pelo pós-teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas no programa PAST 3.0 com nível de significância de  $p < 0,05$  e os gráficos no Excel.

## RESULTADOS

### AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Chironomus sancticaroli*

Os resultados referentes aos 20 testes de sensibilidade estão apresentados na tabela 4, bem como na figura 17, sendo possível verificar que a faixa de sensibilidade da espécie para o KCl variou de 4,72 a 6,75 g.L<sup>-1</sup>, com coeficiente de variação (CV) de 8,85%.

TABELA 5: Valores da Concentração Letal (CL<sub>50</sub> – 48h, g L<sup>-1</sup>) do Cloreto de Potássio (KCl) e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de sensibilidade com *Chironomus sancticaroli*.

Nº do teste	Data	CL50 - 48h	IC (95%)
1	09/06/2014	4,81	4,36 - 5,31
2	09/06/2014	5,81	5,48 - 6,16
3	16/06/2014	5,93	5,68 - 6,19
4	16/06/2014	6,02	5,58 - 6,50
5	25/06/2014	5,95	5,62 - 6,30
6	01/07/2014	6,73	6,19 - 7,40
7	08/07/2014	5,81	5,50 - 6,15
8	14/07/2014	5,27	4,93 - 5,63
9	14/07/2014	5,58	5,25 - 5,92
10	15/07/2014	5,13	4,82 - 5,45
11	15/07/2014	5,85	5,56 - 6,16
12	21/07/2014	6,04	5,46 - 6,67
13	21/07/2014	5,84	5,55 - 6,15
14	22/07/2014	6,16	5,93 - 6,40
15	22/07/2014	6,19	5,91 - 6,48
16	21/10/2014	6,45	5,99 - 6,94
17	26/11/2014	5,05	4,62 - 5,52
18	23/02/2015	4,88	4,42 - 5,40
19	30/03/2015	5,57	5,14 - 6,04
20	04/08/2015	5,6	5,19 - 6,04
Média (X)		5,73	
Variância (S <sup>2</sup> )		0,26	
Desvio Padrão (S)		0,51	
Coef. Variação em % (CV)		8,85	
Faixa de sensibilidade		4,72 - 6,75	



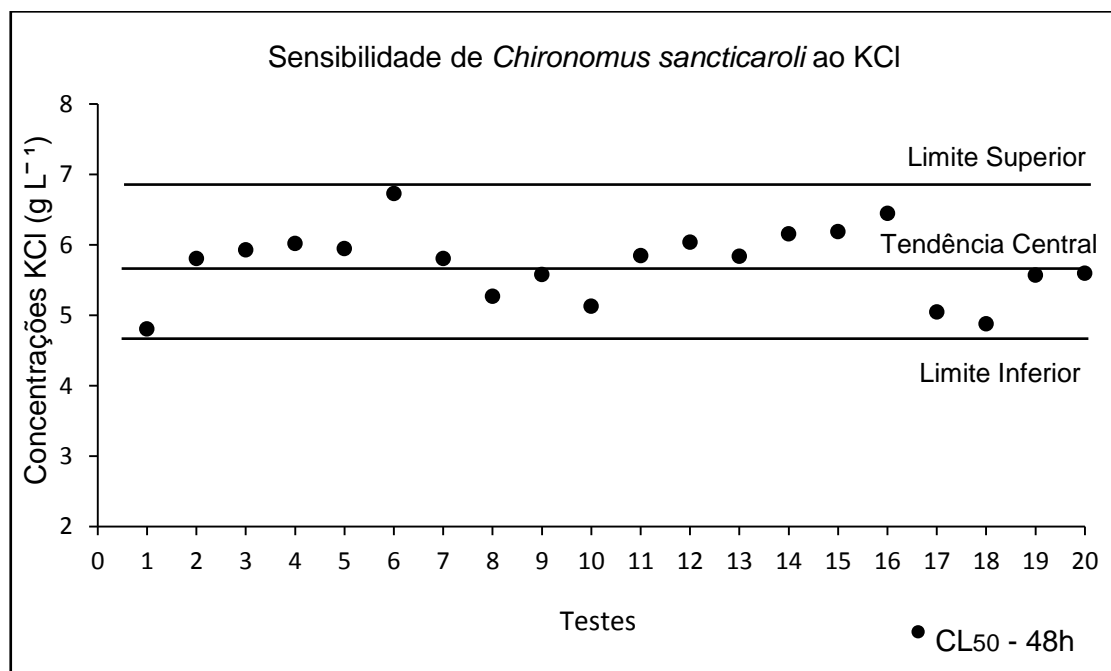


FIGURA 17: Concentrações Letais CL<sub>50</sub> – 48h (g L<sup>-1</sup>) para cada um dos 20 testes realizados, bem como o limite superior e inferior da faixa sensibilidade de *Chironomus sancticaroli* ao Cloreto de Potássio (KCl)

De forma geral, um método ecotoxicológico é considerado bom quando a variação dos resultados, expressa pelo coeficiente de variação (CV), for  $\leq$  a 30% (ENVIRONMENT CANADA, 1990). No presente trabalho o coeficiente de variação obtido foi de 8,85%, portanto, este valor indica que a manutenção da espécie foi realizada em condições uniformes com reduzida ocorrência de variabilidade nas respostas entre os organismos.

A partir destes resultados é possível indicar que a população de *Chironomus sancticaroli* mantida no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária é adequada como organismo teste em bioensaios ecotoxicológicos e que as respostas apresentadas aos poluentes serão homogêneas entre os testes realizados.

## QUANTIFICAÇÃO ANALÍTICA DOS POLUENTES

As concentrações biodisponíveis de malathion, fenantreno e cádmio mensuradas no início (tempo 0h) dos experimentos apresentaram valores próximos das concentrações nominais calculadas para os bioensaios (Tabela 5).

TABELA 6: Concentrações nominais e as mensuradas do malathion, fenantreno e cádmio no tempo 0h dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. M = malathion; M+F = malathion e fenantreno; C+M = cádmio e malathion; M+C+F = malathion, cádmio e fenantreno; F = fenantreno; C+F = cádmio e fenantreno; C = cádmio; C1 = concentração 1; C2 = concentração 2; C3 = concentração 3

Concentrações de Malathion (mg L <sup>-1</sup> )					
	Nominal	Mensurada			
		M	M+F	C+M	M+C+F
C1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
C2	0,0564	0,0459	0,0457	0,0539	0,0517
C3	0,1006	0,1056	0,1017	0,0981	0,1062

Concentrações de Fenantreno (mg L <sup>-1</sup> )					
	Nominal	Mensurada			
		F	M+F	C+F	M+C+F
C1	0,0025	0,0036	0,0036	0,0023	0,0022
C2	1,25	1,47	1,47	1,28	1,25
C3	2,44	2,58	2,55	2,49	2,12

Concentrações de Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )					
	Nominal	Mensurada			
		C	C+M	C+F	M+C+F
C1	0,0010	0,0012	0,001	0,0011	0,0012
C2	3,2	3,0	2,5	2,1	2,8
C3	7,4	6,8	6,2	6,6	5,8

## Malathion

No experimento de exposição individual com o composto malathion foram observadas reduções significativas nos valores mensurados do produto em todos os tempos de amostragem (3, 21, 24, 27, 30, 45 e 48h) quando comparados ao tempo inicial de exposição (tempo 0h). No tempo 3h estas reduções foram de 51, 66 e 76%, respectivamente para as concentrações C1, C2 e C3 e estas reduções atingiram 57, 76 e 77% para as mesmas concentrações no final do experimento (tempo 48h) (Figura 18A).

Na mistura binária de malathion e fenantreno foram observadas reduções significativas nos valores quantificados de malathion em todos os tempos de amostragem nas três concentrações. Estas reduções foram respectivamente de 52, 65 e 75% para as concentrações C1, C2 e C3 no tempo 3h e 57, 76 e 76% para as mesmas concentrações no tempo 48h (Figura 18B).

No experimento com a mistura binária de malathion e cádmio também foram observadas reduções significativas nas quantidades de malathion ao longo do experimento. No tempo 3h as reduções foram de 45, 25 e 54%, respectivamente para as concentrações C1, C2 e C3 e na última amostragem (tempo 48 h) atingiram as taxas de 55, 100 e 100% respectivamente para as mesmas concentrações (Figura 19A).

Na mistura terciária de malathion, cádmio e fenantreno também ocorreram reduções significativas do composto malathion ao longo das 48h de experimento. Estas reduções foram respectivamente de 39, 22 e 53% para as concentrações C1, C2 e C3 no tempo 3h. No final do experimento essas taxas passaram para 37, 100 e 100% para as mesmas concentrações (Figura 19B).

#### Fenantreno

No experimento de exposição individual com o composto fenantreno foram observadas reduções significativas nos valores mensurados do produto em todos os tempos de amostragem (3, 21, 24, 27, 30, 45 e 48h) quando comparados ao tempo inicial de exposição (tempo 0h). No tempo 3h estas reduções foram de 66, 70 e 52%, respectivamente para as concentrações C1, C2 e C3 e estas reduções chegaram a 55, 77 e 82% para as mesmas concentrações no final do experimento (tempo 48h) (Figura 20A).

Na mistura binária de malathion e fenantreno foram observadas reduções significativas nos valores quantificados de fenantreno em todos os tempos de amostragem e para as três concentrações. Estas reduções foram respectivamente de 66, 69 e 53% para as concentrações C1, C2 e C3 no tempo 3h e 56, 76 e 86% para as mesmas concentrações no tempo 48h (Figura 20B).

No experimento com a mistura binária de fenantreno e cádmio também foram observadas reduções significativas nas quantidades de fenantreno ao longo do experimento. No tempo 3h as reduções foram de 9, 14 e 24%, respectivamente para as concentrações C1, C2 e C3 e na última amostragem (tempo 48 h) atingiram as taxas de 54, 91 e 88% respectivamente para as mesmas concentrações (Figura 21A).

Na mistura terciária de fenantreno, cádmio e malathion também ocorreram reduções significativas do composto fenantreno ao longo das 48h de experimento. Estas reduções foram respectivamente de 7, 13 e 19% para as concentrações C1, C2 e C3 no tempo 3h. No final do experimento essas taxas passaram para 55, 90 e 91% para as mesmas concentrações (Figura 21B).

### Cádmio

Em todos os experimentos envolvendo o composto cádmio (exposição individual, mistura com malathion, mistura com fenantreno e mistura com malathion e fenantreno) não foram observadas diferenças significativas nos valores mensurados do cádmio nos tempos de amostragem (24 e 48h) quando comparados ao tempo inicial de exposição (tempo 0h) (Figuras 22 e 23). Apenas na concentração C3 do experimento de mistura de cádmio e fenantreno foi observada uma redução significativa de 25% no tempo de 24h quando comparado ao tempo 0h, mas no tempo 48h dessa mesma concentração a redução passou para apenas 10%, não sendo considerada significativa em relação ao tempo 0h (Figura 23A-C3).

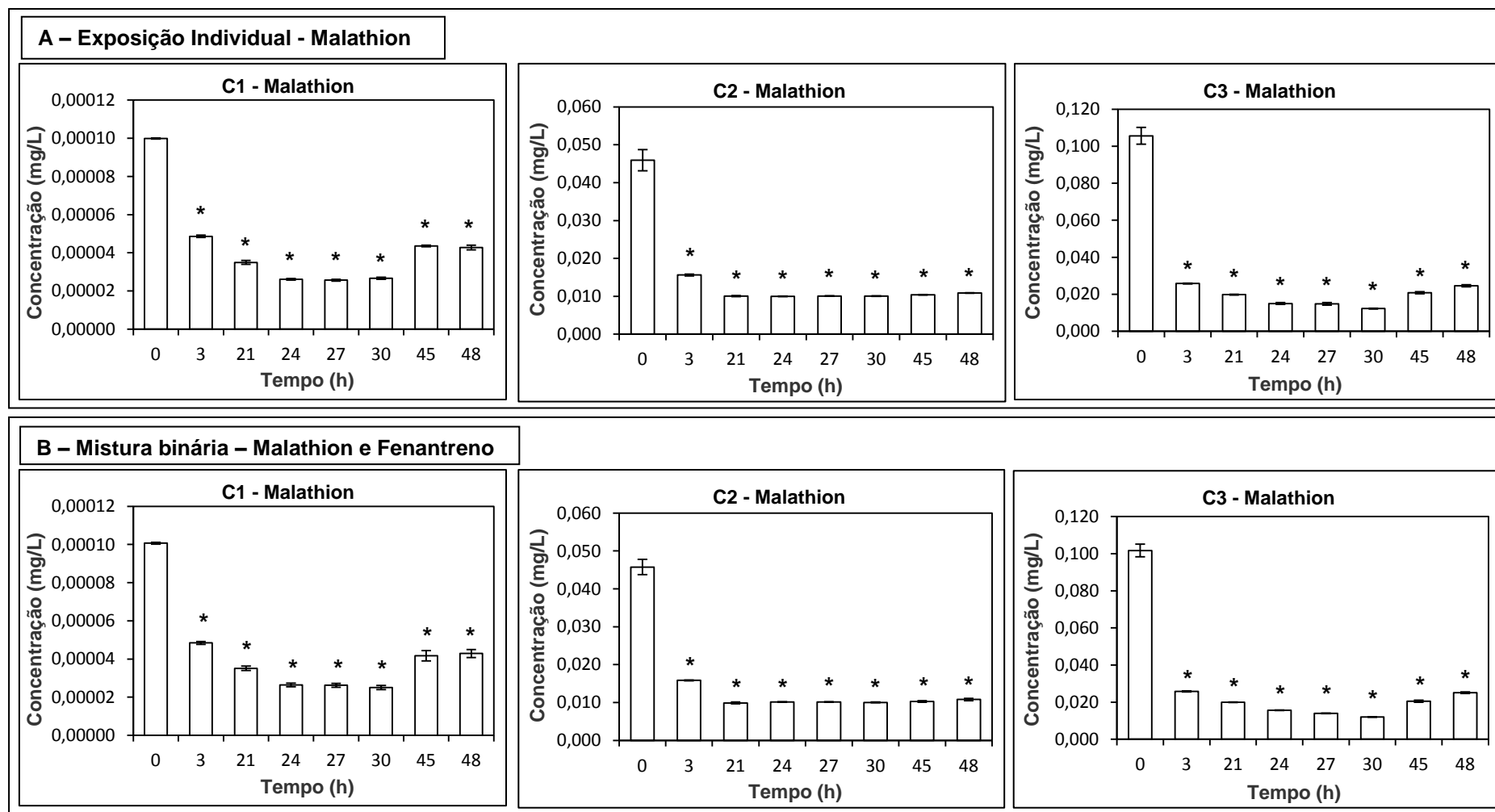


FIGURA 18: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Malathion ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição individual de malathion, B: exposição da mistura binária de malathion e fenantreno. C1 = concentração 1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ); C2 = concentração 2 ( $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$ ); C3 = concentração 3 ( $0,106 \text{ mg L}^{-1}$ ). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

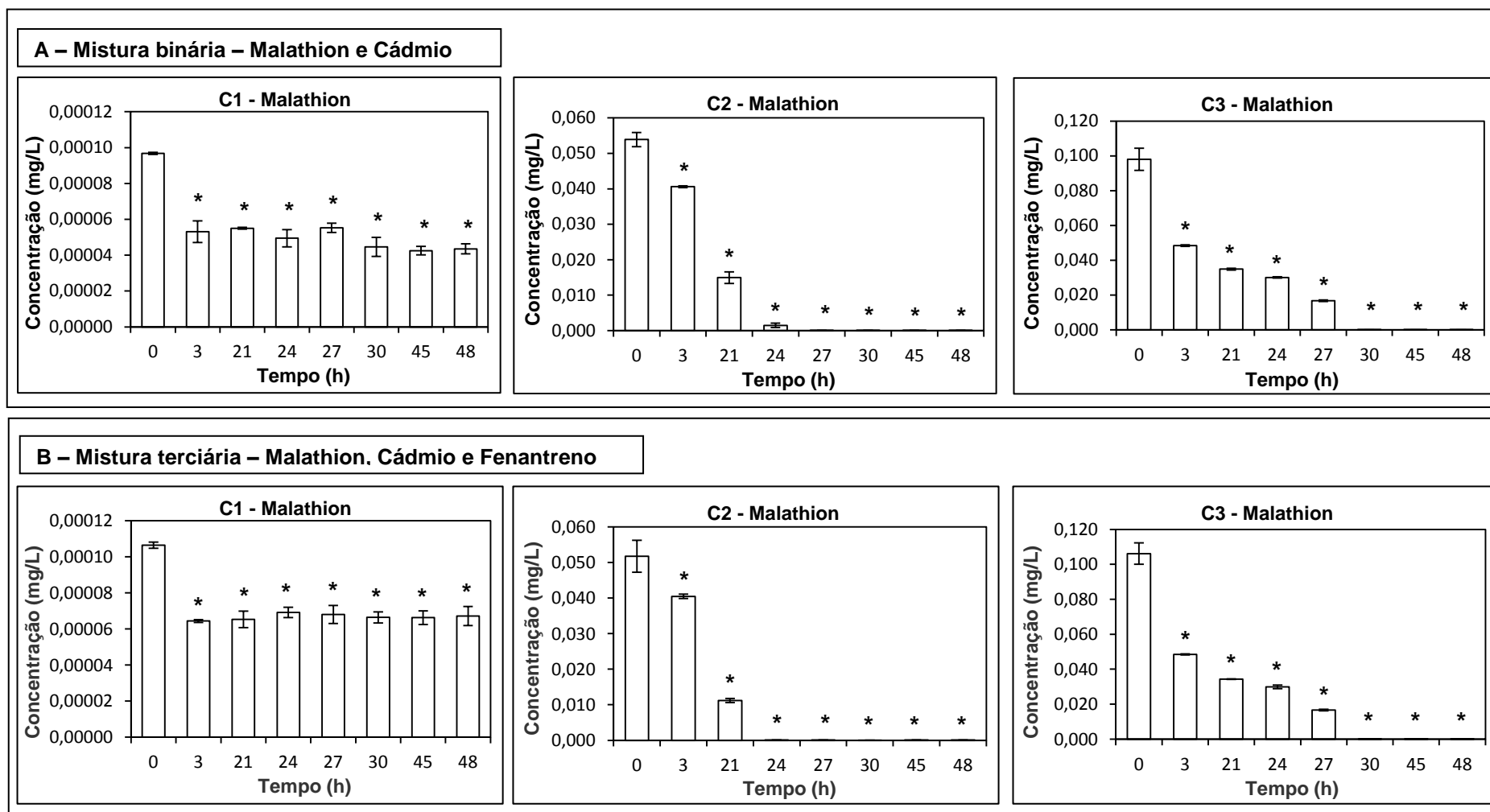


FIGURA 19: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Malathion ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticarioli*. A: exposição da mistura binária de malathion e cádmio, B: exposição da mistura terciária de malathion, cádmio e fenantreno. C1 = concentração 1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ); C2 = concentração 2 ( $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$ ); C3 = concentração 3 ( $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ ). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

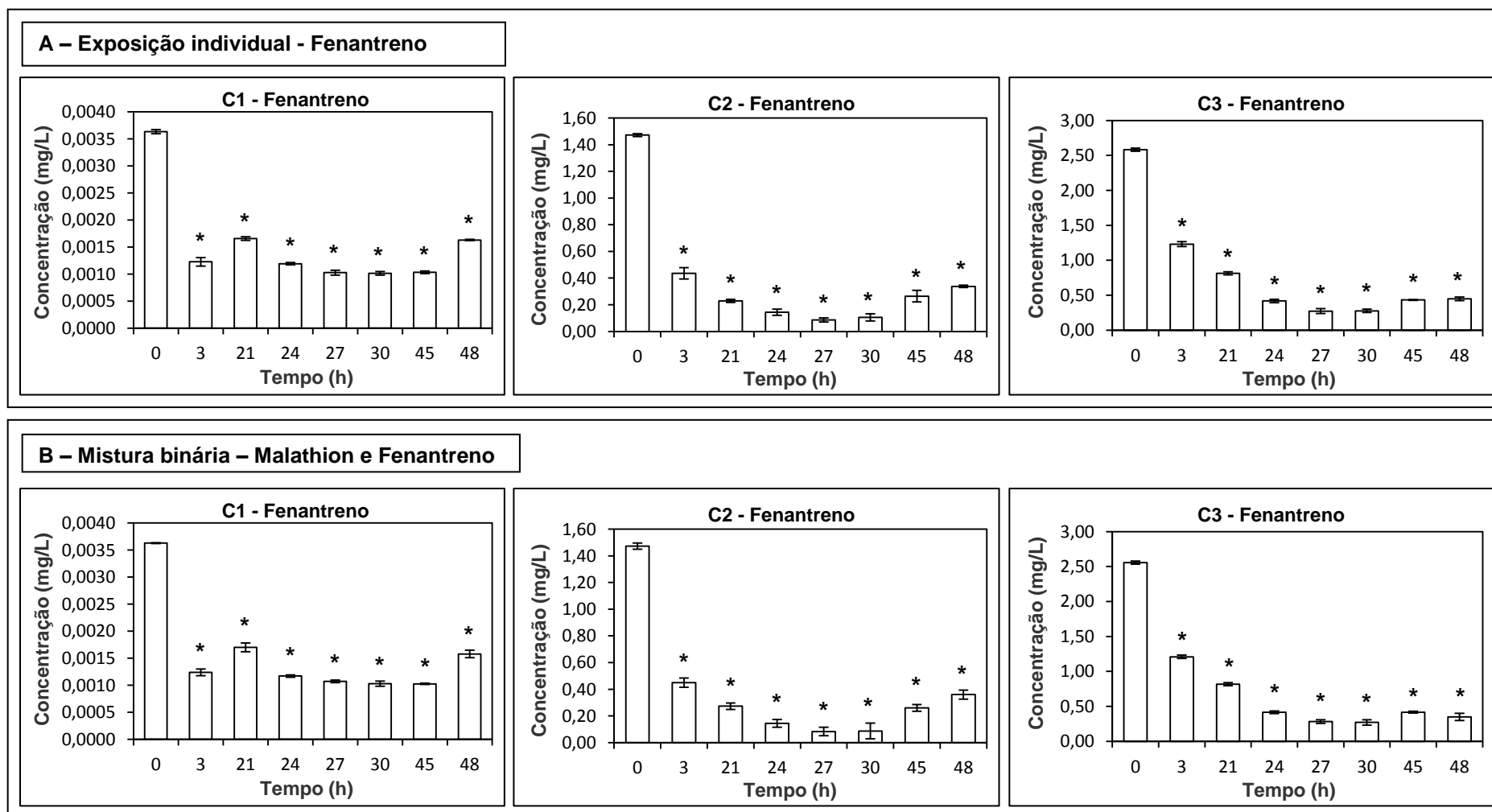


FIGURA 20: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Fenantreno ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticarioli*. A: exposição individual de fenantreno; B: exposição da mistura binária de malathion e fenantreno. C1 = concentração 1 ( $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ ); C2 = concentração 2 ( $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ ); C3 = concentração 3 ( $2,44 \text{ mg L}^{-1}$ ). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

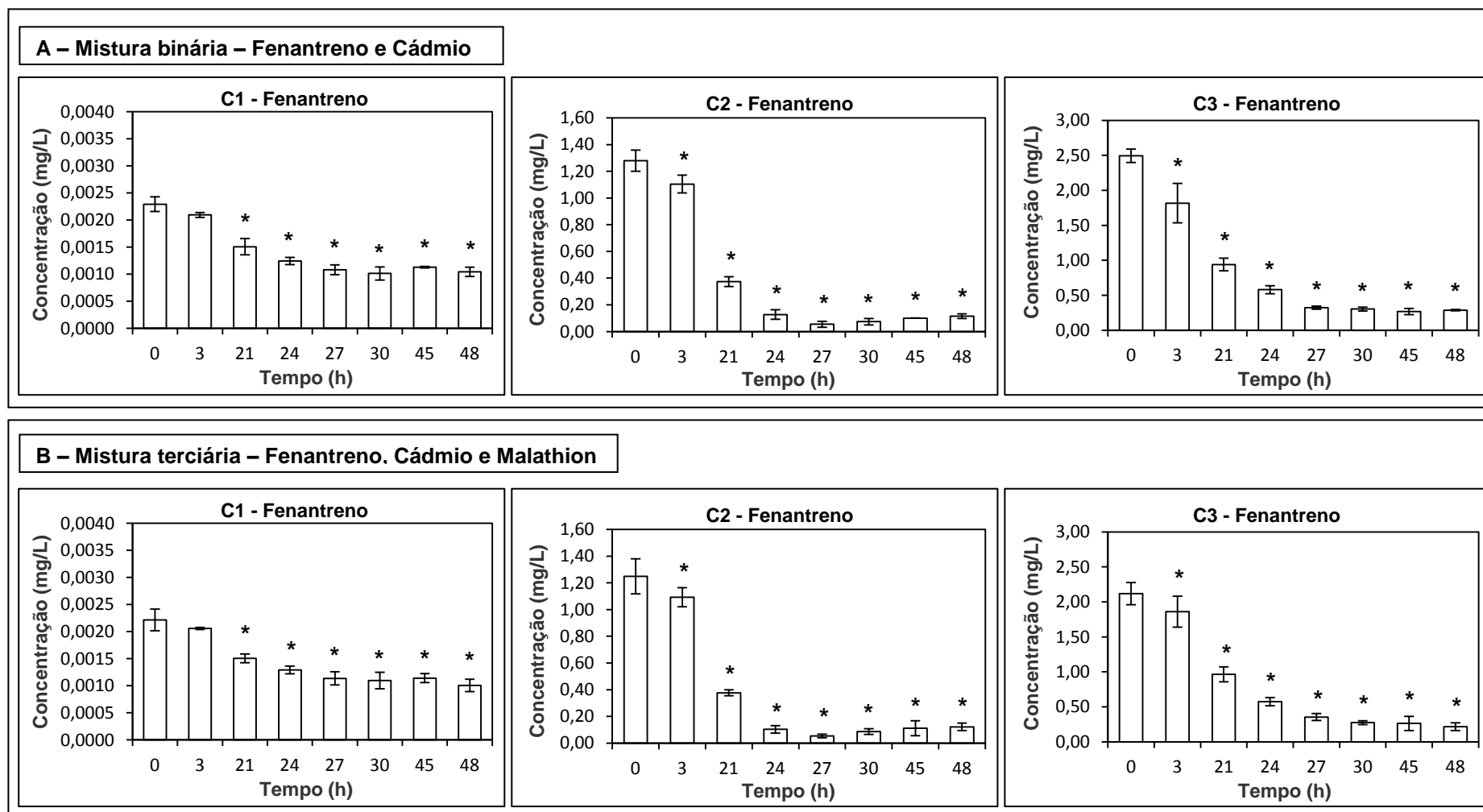


FIGURA 21: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Fenantreno ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição da mistura binária de fenantreno e cádmio, B: exposição da mistura terciária de fenantreno, cádmio e malathion. C1 = concentração 1 (0,0025 mg L<sup>-1</sup>); C2 = concentração 2 (1,25 mg L<sup>-1</sup>); C3 = concentração 3 (2,44 mg L<sup>-1</sup>). \* Indicam diferenças significativas para p < 0,05



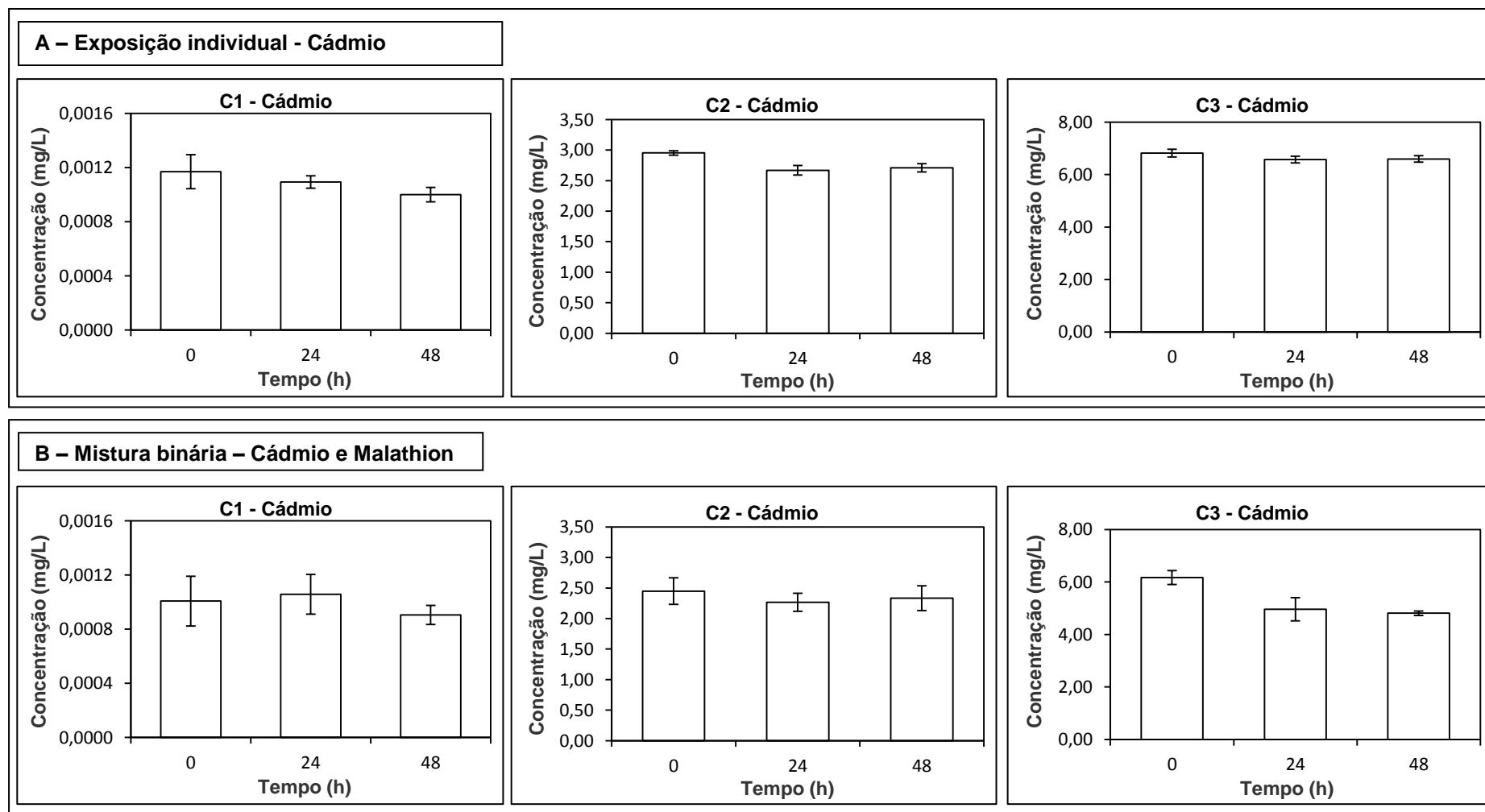


FIGURA 22: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Cádmio ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição individual de cádmio; B: exposição da mistura binária de cádmio e malathion. C1 = concentração 1 ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ); C2 = concentração 2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ ); C3 = concentração 3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

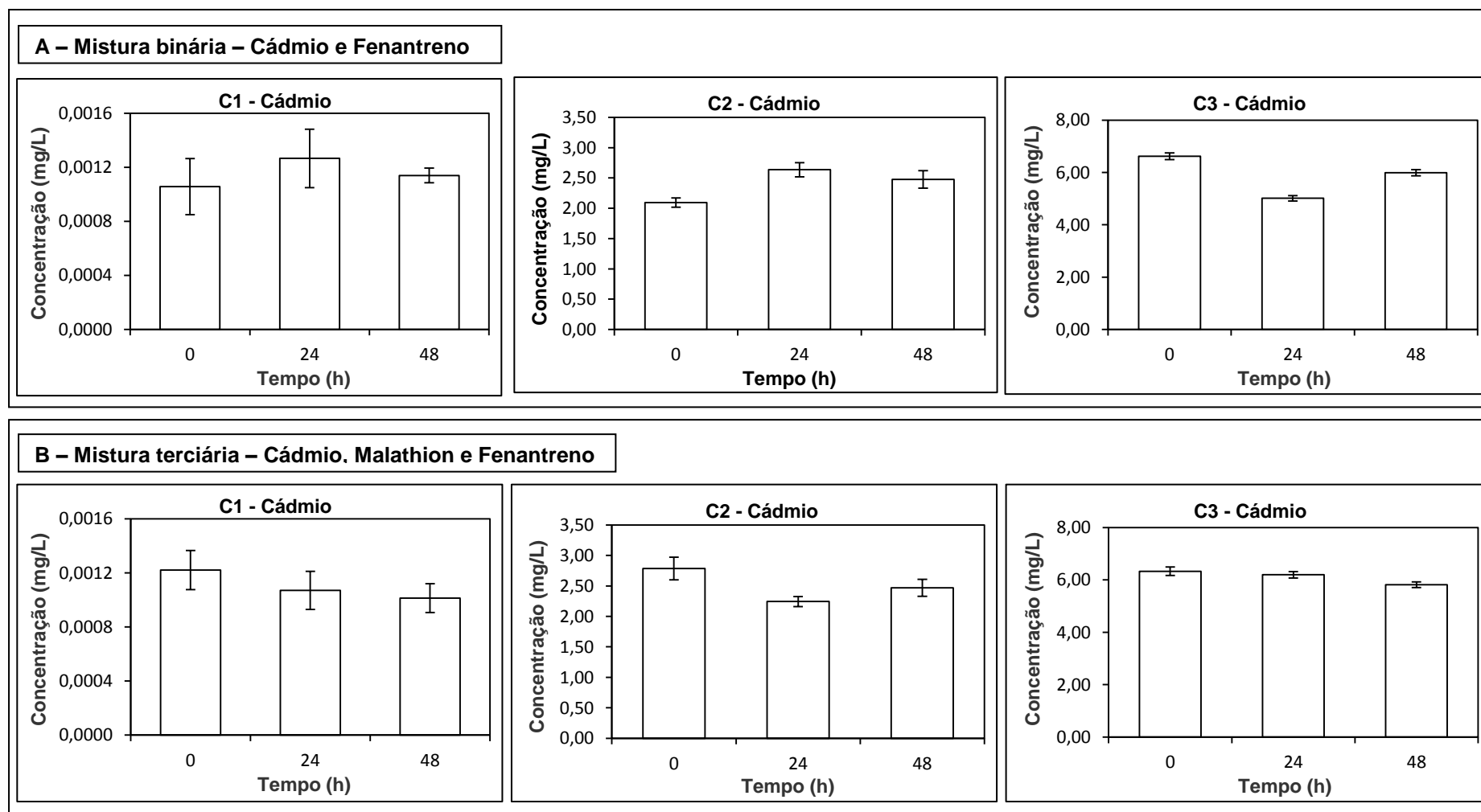


FIGURA 23: Quantificação das concentrações biodisponíveis do poluente Cádmio ao longo dos experimentos com *Chironomus sancticaroli*. A: exposição da mistura binária de cádmio e fenantreno; B: exposição da mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno. C1 = concentração 1 ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ); C2 = concentração 2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ ); C3 = concentração 3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). \* Indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

## FAIXA LETAL DOS POLUENTES PARA *Chironomus sancticaroli*

Os resultados, expressos em  $\text{mg L}^{-1}$ , referentes à faixa letal do inseticida malathion, hidrocarboneto fenantreno e metal cádmio para a população de *Chironomus sancticaroli* estão representados na tabela 6, a qual apresenta as concentrações letais de cada poluente com seus respectivos intervalos de confiança (IC). Os controles apresentaram mortalidade de 0%. É possível observar que para uma mesma concentração letal foram necessárias concentrações diferentes e mais elevadas para cádmio em relação ao fenantreno e malathion, indicando maior toxicidade do inseticida, seguido do HPA e por último o metal.

TABELA 7: Faixa letal dos poluentes malathion, fenantreno e cádmio para espécie *Chironomus sancticaroli* expressa em  $\text{mg L}^{-1}$  e seus intervalos de confiança (IC)

Concent. letal	Malathion ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Fenantreno ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Cádmio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	Valor	IC	Valor	IC	Valor	IC
CL <sub>2</sub>	0,017	0,014 – 0,020	0,31	0,23 – 0,39	0,59	0,41 – 0,78
CL <sub>10</sub>	0,033	0,028 – 0,037	0,68	0,58 – 0,77	1,53	1,20 – 1,86
CL <sub>25</sub>	0,056	0,050 – 0,061	1,25	1,13 – 1,38	3,23	2,74 – 3,73
CL <sub>50</sub>	0,100	0,093 – 0,108	2,44	2,10 – 2,98	7,41	6,55 – 8,41
CL <sub>70</sub>	0,157	0,145 – 0,172	4,10	3,30 – 5,58	14,13	12,25 – 16,65
CL <sub>90</sub>	0,302	0,269 – 0,345	8,69	6,26 – 13,93	35,92	29,02 – 46,65
CL <sub>99</sub>	0,740	0,617 – 0,921	24,46	15,04 – 49,48	130,02	92,90 – 198,20

## MORTALIDADE

Nos bioensaios de toxicidade aguda com a população de *Chironomus sancticaroli* exposta ao inseticida malathion, hidrocarboneto fenantreno e metal cádmio individualmente e suas misturas binárias e terciárias foi possível observar uma sobrevivência das larvas nos controles água e solvente acima de 96,4%. Já a mortalidade observada indica uma relação concentração-dependente em todos os experimentos, ou seja, quanto maior a concentração maior a mortalidade encontrada (Tabela 7).



A exposição ao inseticida malathion e a mistura binária de cádmio e fenantreno apresentaram maior porcentagem de larvas com alteração comportamental do que larvas mortas para as três concentrações/misturas testadas. Já a exposição ao fenantreno, cádmio e a mistura binária de malathion e fenantreno apresentaram a mesma porcentagem entre larvas com alterações de comportamento e larvas mortas na concentração/mistura C1, entretanto, nestas mesmas situações foi observado maior porcentagem de larvas com alteração comportamental do que larvas mortas nas concentrações/misturas C2 e C3 (Tabela 7).

A mistura binária de cádmio e malathion e a mistura terciária dos poluentes apresentou maiores porcentagens de larvas com alteração de comportamento do que larvas mortas na mistura C2. Já para a mistura C3 dessas mesmas situações a porcentagem de larvas mortas superou a porcentagem de larvas com alteração de comportamento (Tabela 7).

Quando somadas as porcentagens de larvas com alteração de comportamento com as mortas observa-se que o experimento com maior efeito em *Chironomus sancticaroli* é a exposição da mistura binária de malathion e fenantreno, com porcentagens de 2,2, 84,1 e 98,1%, respectivamente para as concentrações C1, C2 e C3. A concentração C3 do experimento com a mistura terciária dos três poluentes também apresentou a soma das porcentagens de larvas com alteração de comportamento e mortas de 98,6%, indicando que essa mistura também tem impacto em *Chironomus sancticaroli* (Tabela 7).

Comparando as porcentagens dos efeitos de alteração de comportamento e mortalidade causada pelo malathion e fenantreno de forma individual com a mistura binária desses compostos, foi possível detectar que a mistura proporciona maiores efeitos do que as exposições individuais em todas as concentrações avaliadas (Tabela 7).

Estes dados podem ser confirmados através dos modelos de toxicidade de misturas *concentration addition* (CA) e *independent action* (IA) utilizados para se prever os efeitos combinados do malathion e fenantreno. Foi possível observar que os efeitos observados das concentrações C2 e C3 da mistura do inseticida com o hidrocarboneto foram maiores que as curvas de

previsão CA e IA, indicando o efeito sinérgico dessa mistura no que diz respeito à mortalidade das larvas de *Chironomus sancticaroli* (Figura 24A).

Os efeitos de larvas alteradas e mortas ( $m + M$  da tabela 7), em porcentagem, da concentração C1 da exposição individual de malathion foi maior que a mistura binária de malathion e cádmio. Já nas concentrações C2 e C3 os efeitos das exposições individuais de malathion e cádmio foram menores quando comparados aos efeitos da exposição binária dos dois poluentes (Tabela 7). Este sinergismo encontrado para a toxicidade da mistura nas concentrações mais elevadas é corroborado através dos resultados da previsão dos modelos CA e IA, os quais indicam que os efeitos observados para a mistura foram maiores do que o previsto pelos modelos (Figura 24B).

Comparando as porcentagens de mortalidade e de alteração comportamental gerada pelo fenantreno e cádmio individualmente com a mistura dos dois poluentes, é possível perceber que a exposição individual de fenantreno gerou maiores efeitos na concentração C1. A exposição individual de cádmio apresentou maiores efeitos para a concentração C2 e a mistura dos dois compostos gerou maiores alterações e mortalidade na concentração C3 (Tabela 7). De acordo com a previsão dos modelos de misturas, os efeitos da concentração C2 observados para a mistura binária de cádmio e fenantreno se encaixa com o modelo IA e a concentração C3 não se encaixaria em nenhum modelo, sendo considerado sinergismo (Figura 24C).

Para a mistura terciária dos três compostos foram observados maiores efeitos de mortalidade e alterações comportamentais quando comparados aos resultados das exposições individuais de cada composto (Tabela 7). Entretanto, segundo o modelo de toxicidade de misturas, os efeitos observados para a concentração C2 seriam bem representados tanto pelo modelo CA quanto pelo IA. Já para a concentração C3 os modelos subestimariam os efeitos, sendo esse considerado sinérgico em relação às exposições individuais dos compostos (Figura 24D).

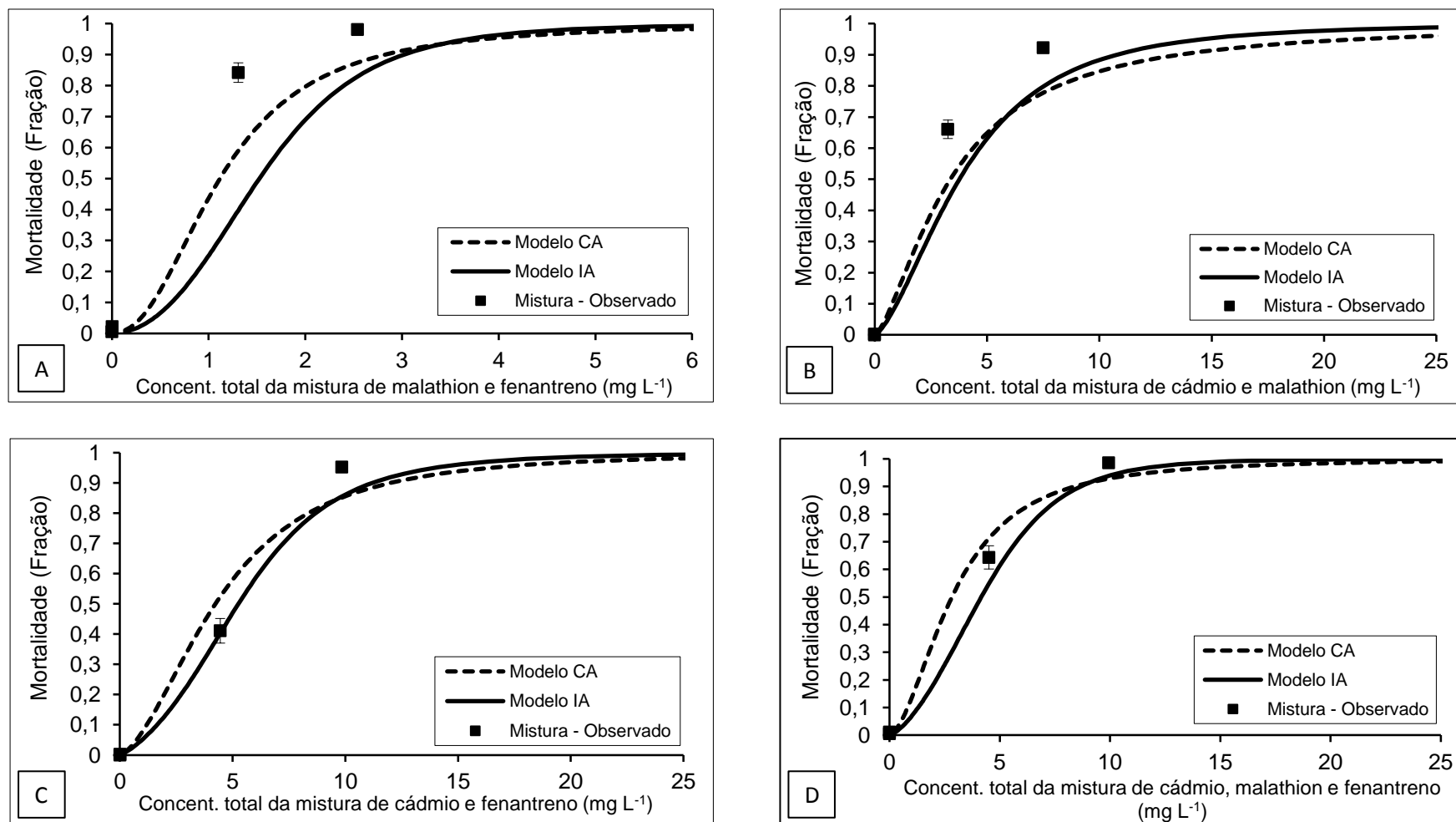


FIGURA 24: Modelos CA, IA e a toxicidade observada para: (A) mistura binária de malathion e fenantreno; (B) mistura binária de cádmio e malathion; (C) mistura binária de cádmio e fenantreno; (D) mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno. Modelo CA = previsão de acordo com o modelo *concentration addition*; Modelo IA = previsão de acordo com o modelo *independent action*; Mistura – Observado = toxicidade observada para a mistura

## BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

### Malathion

A espécie *Chironomus sancticaroli* exposta ao inseticida malathion não apresentou alteração significativa na atividade da enzima AChE na concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ) quando comparada aos controles água e solvente. No entanto, inibições significativas de 75,6% e 84,2% na atividade da enzima AChE ocorreram nas concentrações C2 e C3 ( $0,0564$  e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente, quando comparadas ao controle solvente (Figura 25A).

Analisando os resultados da enzima EST alfa foi observado um aumento significativo da atividade enzimática de 39,9% na concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ) de malathion quando comparada ao controle água, entretanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima quando esta mesma concentração foi comparada ao controle solvente. Já nas concentrações C2 e C3 ( $0,0564$  e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ ) de malathion ocorreu um diminuição significativa da atividade da EST alfa de 61,0 e 73,8%, respectivamente, quando comparadas ao controle solvente (Figura 25C).

Já a enzima EST beta não apresentou diferenças significativas entre a concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ) de malathion e os controles água e solvente. Nas concentrações C2 e C3 ( $0,0564$  e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi observada uma diminuição significativa da atividade enzimática da EST beta de 50,1 e 59,7%, respectivamente, quando comparadas ao controle solvente (Figura 25D).

Para a enzima CAT não foram observadas alterações significativas em todas as concentrações de malathion testadas quando comparadas aos controles água e solvente, exceto para a concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ), a qual apresentou uma atividade significativamente aumentada em 23,6% quando comparada ao controle água (Figura 25E).

A enzima SOD apresentou alterações significativas entre os controles água e solvente, sendo que a atividade da enzima foi maior no controle solvente. Na concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ) de malathion a atividade da SOD mostrou-se 68,1% significativamente maior quando comparada ao controle solvente. Nas concentrações C2 e C3 ( $0,0564$  e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ ) não



foram observadas alterações significativas quando comparadas ao controle solvente (Figura 25F)

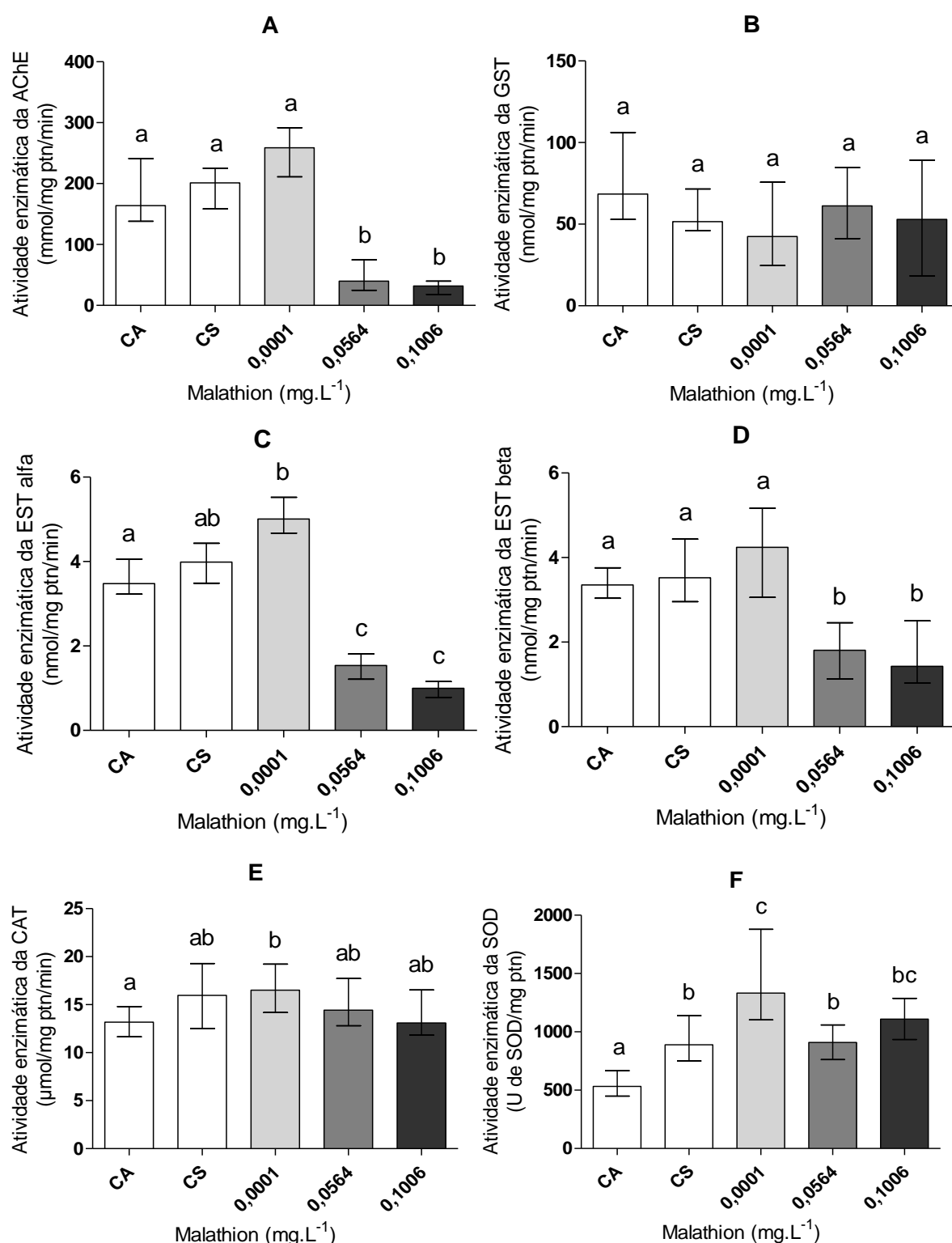


FIGURA 25: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticarioli* expostos a três concentrações do inseticida malathion por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

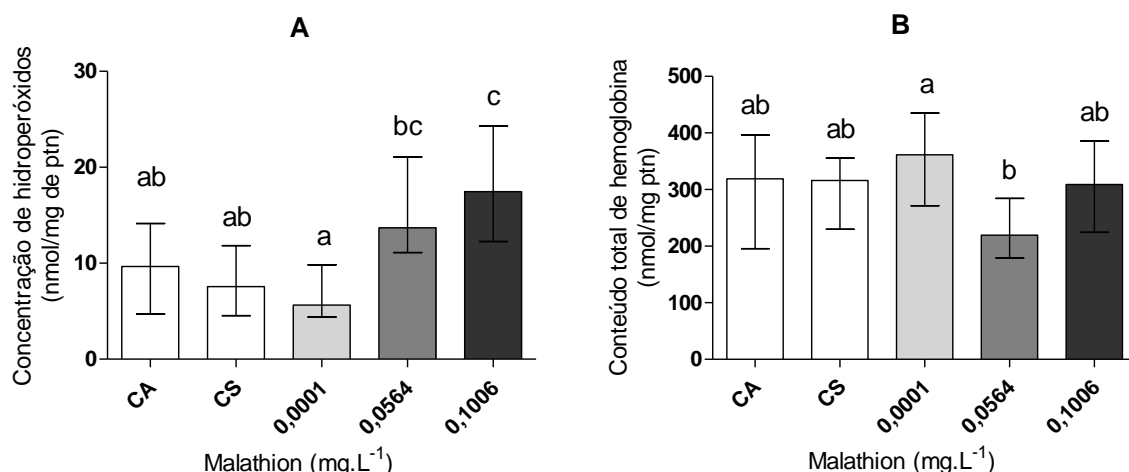


FIGURA 26: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do inseticida malathion por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

As concentrações C1 e C2 (0,0001 e 0,0564 mg L<sup>-1</sup>) de malathion não apresentaram alterações significativas de peroxidação lipídica (LPO) em relação aos controles água e solvente. Já para a concentração C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup>) foi observado aumento significativo de 54,9% na concentração de hidroperóxidos em relação ao controle solvente (Figura 26A).

A enzima GST e o conteúdo total de hemoglobinas mostraram-se inalterados em todas as concentrações de malathion testadas quando comparado aos controles água e solvente (Figura 25B e 26B).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para todos os dados de atividade enzimática, danos de LPO e conteúdo total de hemoglobina mensurados após exposição ao malathion. O componente principal 1 (PC1) explicou 41,29% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 24,56 e 16,88% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 82,77% (Figura 27). A representação gráfica dos escores dos componentes principais PC1, PC2 e PC3 indicam o agrupamento da concentração C1 (0,0001 mg L<sup>-1</sup>) de malathion com o controle e as concentrações C2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup>) e C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup>) de malathion formando outro agrupamento (Figura 27A, B e C). Os respectivos biplots indicam que a LPO, EST alfa, EST beta, AChE estão contribuindo para a variação dos dados

para o PC1, enquanto que a enzima GST está contribuindo para a variação no PC2 (Figura 27D, E e F).

As informações da análise de componentes principais em conjunto indicam que os efeitos observados para a concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ) de malathion estão mais relacionados com o controle do experimento e os efeitos observados para as concentrações C2 e C3 ( $0,0564$  e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ ) estão mais relacionados entre si e as enzimas EST alfa, EST beta, AChE e a LPO contribuíram mais para essa variação justamente porque os efeitos foram maiores nesses biomarcadores quando comparados ao controle solvente e concentração C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ ) de malathion.

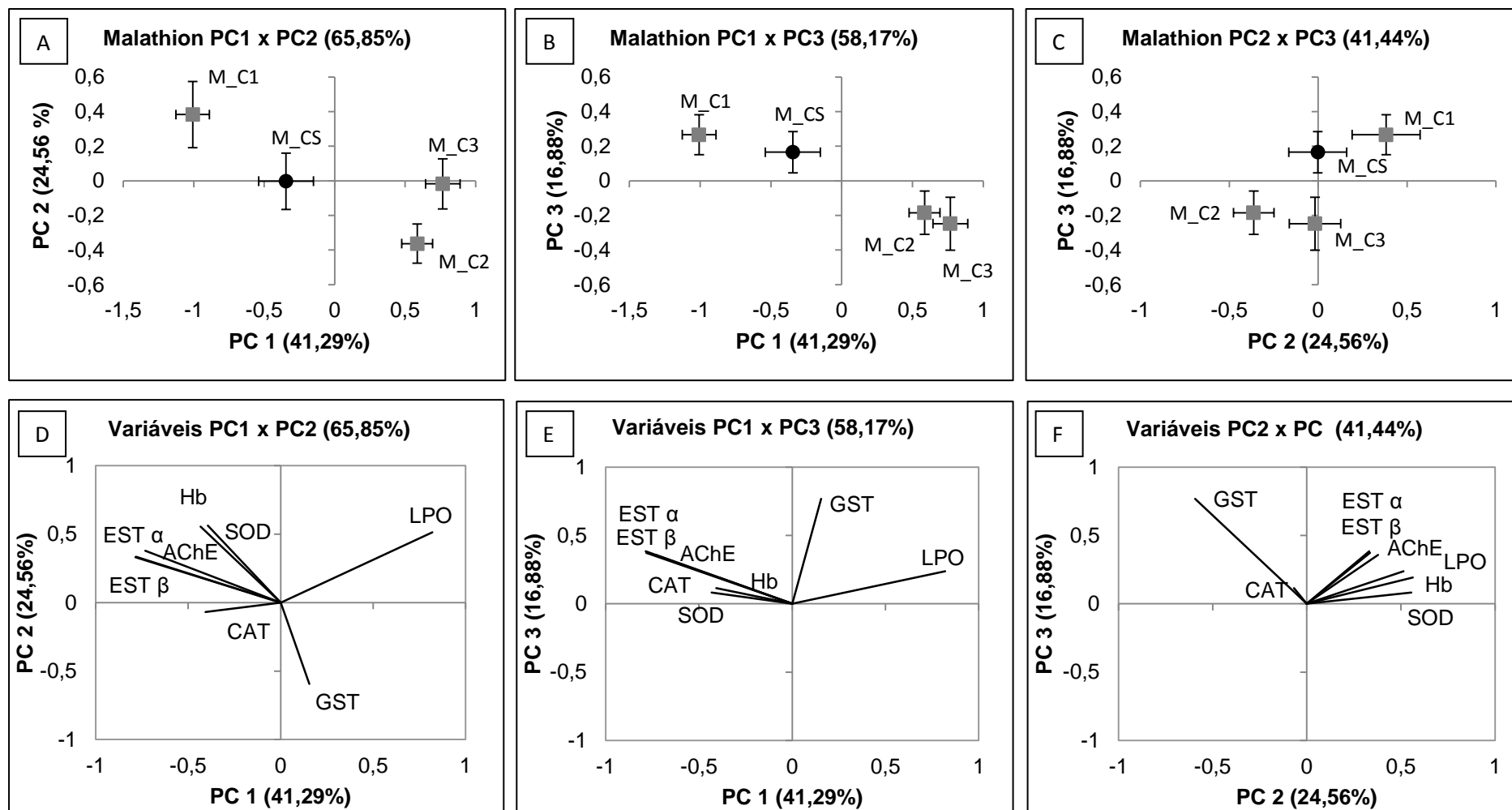


FIGURA 27: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição ao malathion e os respectivos biplots. M\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

## Fenantreno

A espécie *Chironomus sancticaroli* exposta ao hidrocarboneto fenantreno na concentração C1 ( $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentou redução significativa na atividade das enzimas GST e EST beta, respectivamente de 24,3 e 15,4% em relação ao controle solvente (Figura 28).

A concentração C2 ( $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) de fenantreno apresentou redução significativa na atividade das enzimas GST, EST alfa, EST beta e SOD, respectivamente de 20,8, 13,2, 13,0 e 28,7% em relação ao controle solvente (Figura 28).

Na exposição C3 ( $2,44 \text{ mg L}^{-1}$ ) de fenantreno foi observado reduções significativas de 24,3, 23,3, 19,4, 13,9, na atividade das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, em relação ao controle solvente (Figura 28).

A enzima SOD apresentou alterações significativas entre os controles água e solvente, sendo que a atividade da enzima foi maior no controle solvente. Nas concentrações C1 e C2 ( $0,0025$  e  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) de fenantreno foram observadas reduções significativas de 41,8 e 28,7%, respectivamente, em relação ao controle solvente, entretanto, não foram observadas diferenças significativas nestas concentrações comparadas ao controle água. Na concentração C3 ( $2,44 \text{ mg L}^{-1}$ ) de fenantreno não foram observadas alterações significativas com relação ao controle solvente, mas quando comparada ao controle água pode-se observar um aumento significativo de 37,5% (Figura 28F).

O conteúdo total de hemoglobinas em *Chironomus sancticaroli* após a exposição ao fenantreno não apresentou alterações significativas nas três concentrações expostas quando comparadas ao controle solvente. Entretanto, as concentrações C1 e C3 ( $0,0025$  e  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$ ) tiveram reduções significativas de 35,7 e 53,1%, respectivamente, quando comparadas ao controle água (Figura 29B).

Não foi encontrado dano de peroxidação lipídica e alterações na enzima CAT para nenhuma das três concentrações de fenantreno testadas quando comparadas aos controles água e solvente (Figura 28 e 29A).

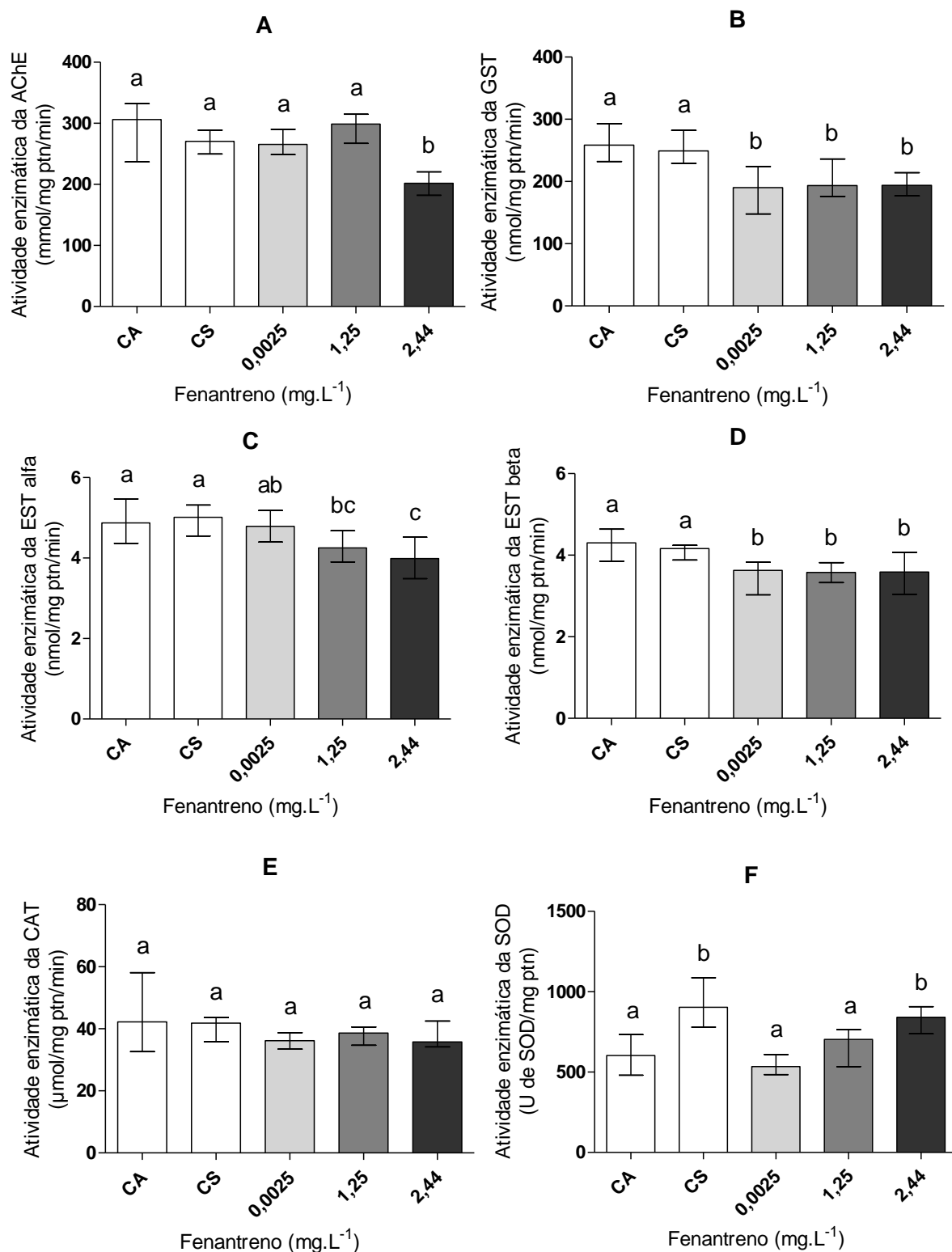


FIGURA 28: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticarloi* expostos a três concentrações do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutationa S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil ( $n = 20$  para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

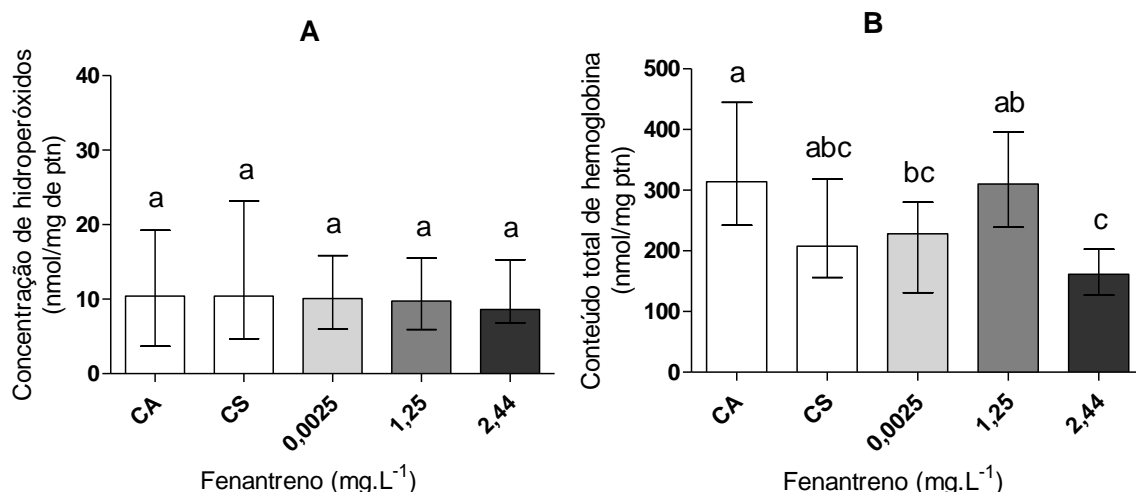


FIGURA 29: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticarloi* expostos a três concentrações do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água e CS = controle solvente). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para todos os biomarcadores bioquímicos após exposição ao fenantreno. O componente principal 1 (PC1) explicou 53,69% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 27,68 e 9,26% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 90,63% (Figura 30). A representação gráfica dos escores do PC1 x PC2 indica praticamente um único agrupamento, contendo todos os tratamentos de fenantreno, apenas com a concentração C3 (2,44 mg L<sup>-1</sup>) um pouco deslocada. Já o PC1 x PC3 e PC2 X PC3 indicam o agrupamento das três concentrações estando o controle solvente afastado desse agrupamento (Figura 30 A, B e C). O respectivo biplot para a análise de PC1 x PC2 indica que a LPO, EST alfa, EST beta e GST estão contribuindo para a variação dos dados para o PC1, enquanto que AChE, SOD e conteúdo de Hb estão contribuindo para a variação no PC2 (Figura 30D). O biplot da análise de PC1 x PC3 indica que a LPO é responsável pelas variações no PC1 e a maioria dos outros biomarcadores explicariam o PC3 (Figura 30E). Já no biplot de PC2 x PC3 é possível observar que o conteúdo total de Hb e a AChE explicariam as variações no PC2 e a SOD, CAT, EST alfa, EST beta, GST e AChE explicariam as variações no PC3 (Figura 30F).

As informações da análise de componentes principais em conjunto indicam em um primeiro momento que as respostas dos biomarcadores bioquímicos são aproximadas para todos os tratamentos de fenantreno, entretanto foi possível separar o controle solvente do resto dos tratamentos, embora essa variação seja suportada por menores taxas de explicação.



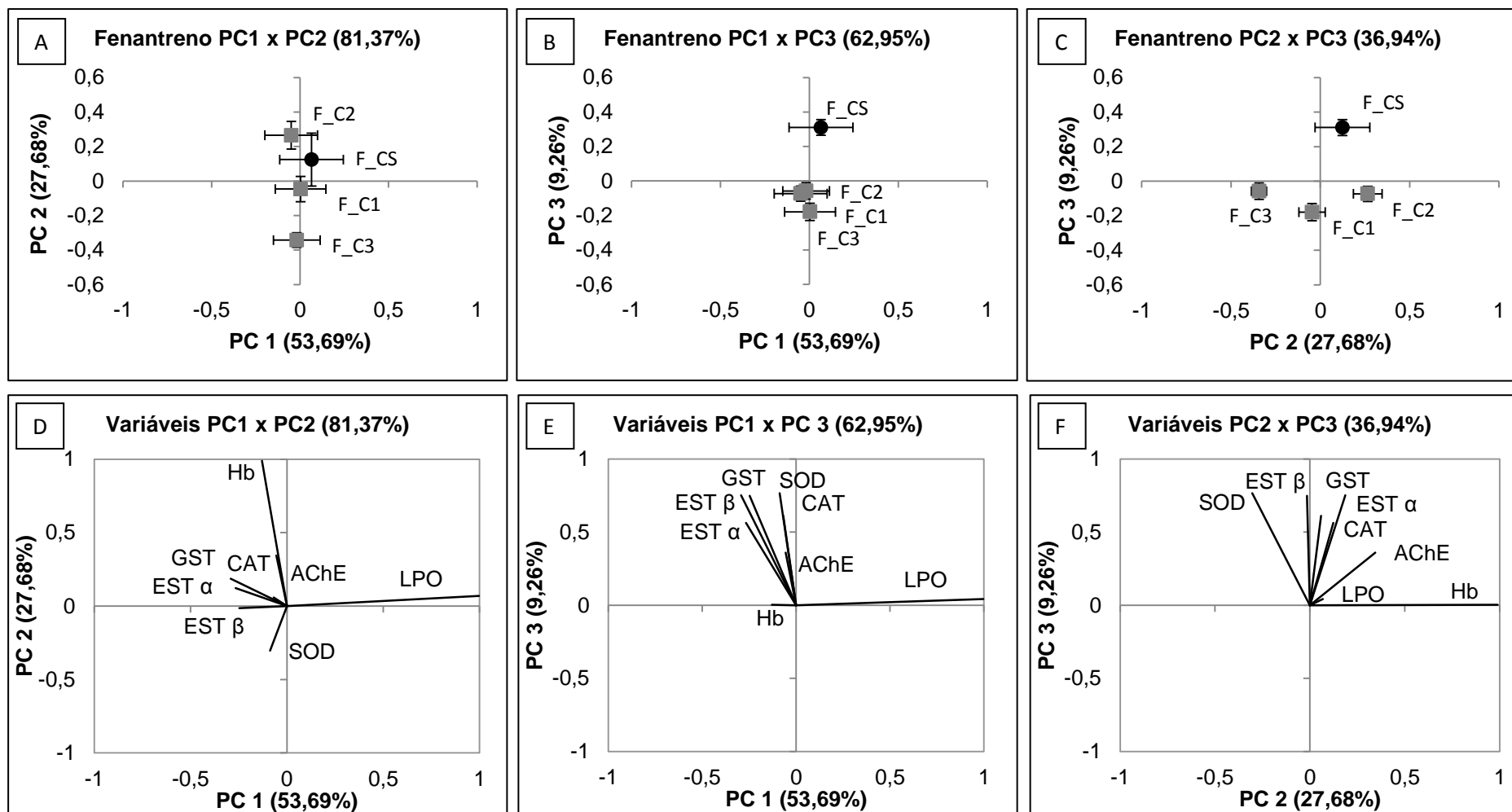


FIGURA 30: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição ao fenantreno e os respectivos biplots. F\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

## Cádmio

Quando as larvas de *Chironomus sancticaroli* foram expostas a concentração C1 ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) do metal cádmio foram observadas alterações significativas apenas na atividade da enzima CAT, a qual apresentou redução significativa de 18,7% quando comparada ao controle água (Figura 31 E).

Já na concentração C2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cádmio reduções significativas de 35,9, 35,8, 44,1, 25,4, 69,8% foram observadas, respectivamente para as atividades das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta e conteúdo de Hb quando comparadas ao controle água. Nesta mesma concentração foram observados aumentos significativos de 41,3% na atividade da SOD em relação ao controle água (Figuras 31 e 32).

Na exposição C3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cádmio reduções significativas foram encontradas para a atividade das enzimas AChE, GST, EST alfa e para o conteúdo de Hb respectivamente de 34,9, 45,3, 29,0, 60,0%. Nesta mesma concentração foram observados aumentos significativos de 22,3% na atividade da enzima SOD em relação ao controle água (Figuras 31 e 32).

Não foi encontrado dano de peroxidação lipídica para nenhuma das três concentrações de cádmio testadas quando comparada ao controle água (Figura 32A).

A análise de componentes principais (PCA) realizada com os biomarcadores bioquímicos após a exposição ao cádmio indicou que o componente principal 1 (PC1) explicou 45,29% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 29,05 e 10,02% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 84,36% (Figura 33). A representação gráfica dos escores dos componentes principais PC1, PC2 e PC3 indica dois agrupamentos, um formado pela concentração C1 ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cádmio e pelo controle água e outro agrupamento formado pelas concentrações C2 e C3 ( $3,2$  e  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figura 33 A, B e C). Os respectivos biplots para a análise PC1 x PC2 indicam que a AChE, EST alfa, EST beta, GST, CAT, SOD e o conteúdo total de Hb estão contribuindo para a variação dos dados para o PC1 e a LPO está contribuindo para a variação no

PC2 (Figura 33D). As atividades das enzimas GST, CAT, SOD e AChE explicam as variações no PC3 (Figura 33 E e F).

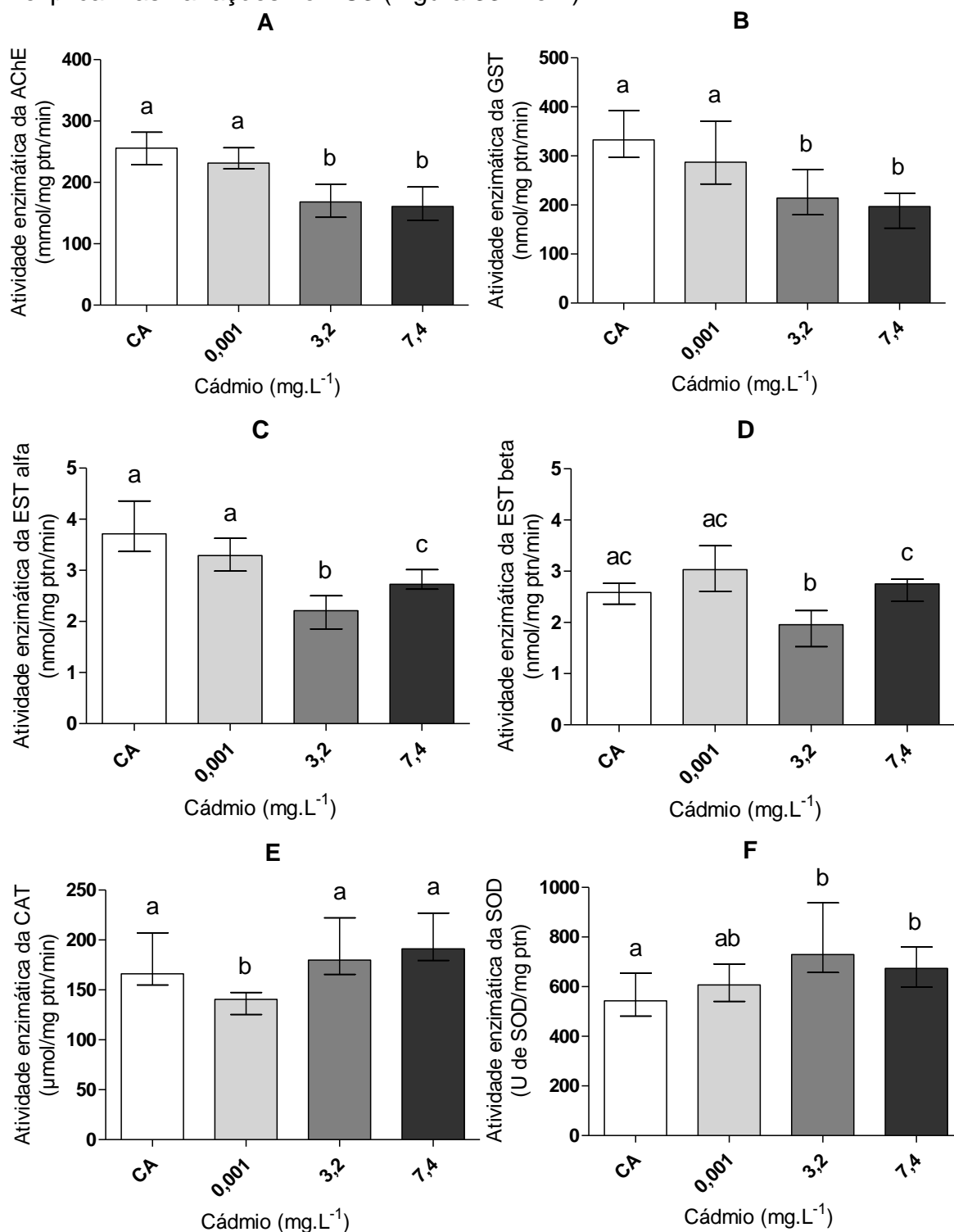


FIGURA 31: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticarioli* expostos a três concentrações do metal cádmio por 48h (CA = controle água). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

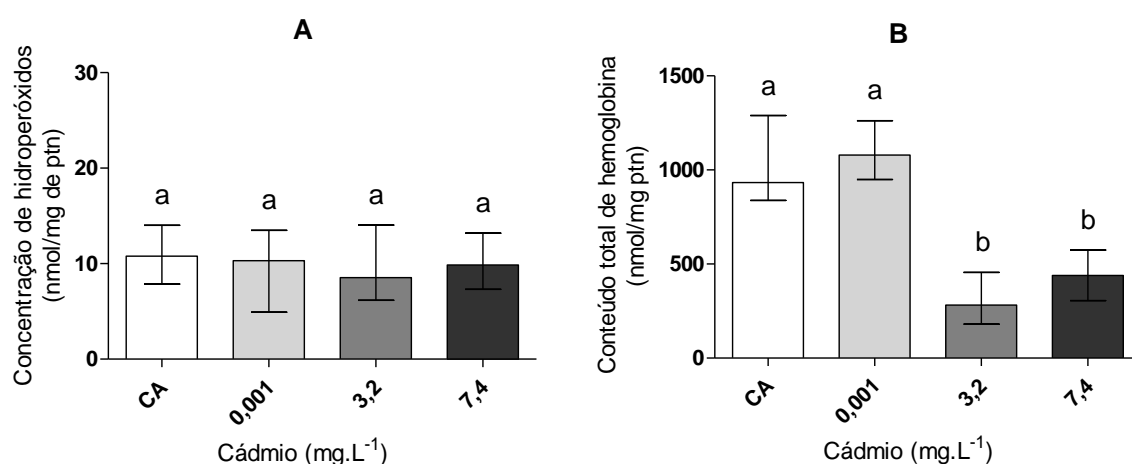


FIGURA 32: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos a três concentrações do metal cádmio por 48h (CA = controle água). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$  (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

Analisando as informações em conjunto é possível indicar que os efeitos observados sobre os biomarcadores são mais parecidos entre a concentração C1 (0,001 mg L<sup>-1</sup>) e o controle água assim como entre as concentrações C2 e C3 (3,2 e 7,4 mg L<sup>-1</sup>). As atividades enzimáticas que explicam as variações entre esses três agrupamentos são justamente as que apresentaram maiores alterações nos ensaios enzimáticos entre os tratamentos com cádmio.

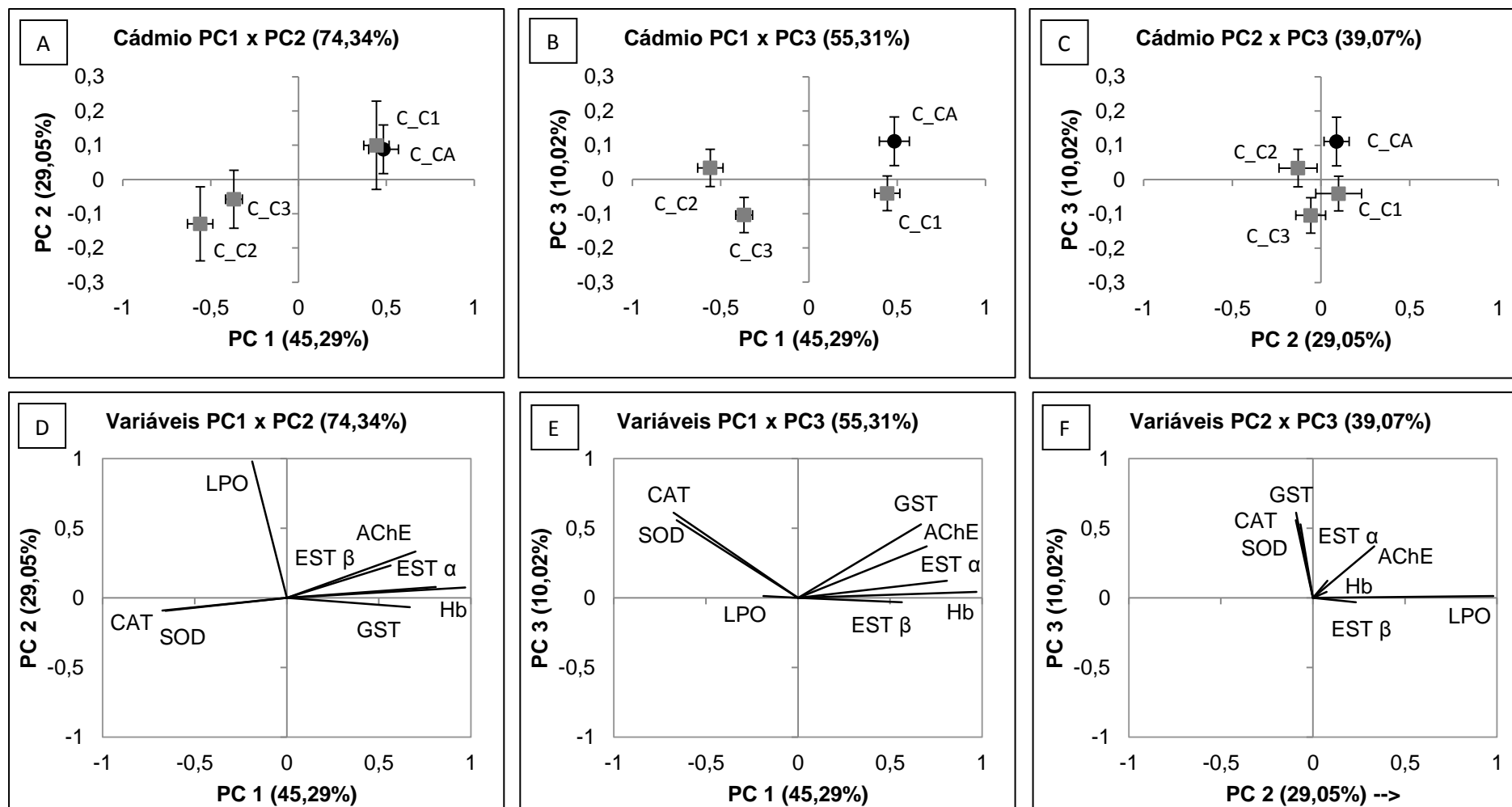


FIGURA 33: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição ao cádmio e os respectivos biplots. C\_CA = controle água (símbolo redondo preto); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Mistura de malathion e fenantreno

Quando os imaturos de *Chironomus sancticaroli* foram expostos à mistura C1 de malathion e fenantreno ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) não foram observadas alterações em nenhum dos biomarcadores enzimáticos avaliados em comparação com o controle solvente.

Na mistura C2 ( $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) foram observadas reduções significativas nas atividades das enzimas AChE, EST alfa e EST beta, respectivamente de 91,7, 77,5 e 60,5% em relação ao controle solvente (Figura 34).

Na mistura C3 ( $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) foram observadas reduções significativas nas atividades das enzimas AChE, EST alfa e EST beta, respectivamente de 95,2, 84,0 e 68,7% em relação ao controle solvente. Nessa mesma mistura foram observados aumentos significativos de 27,3 e 43,1% na atividade da CAT e SOD em relação ao controle solvente (Figura 34).

A atividade da enzima GST e a LPO não apresentaram alterações significativas em relação aos controles água e solvente em nenhuma das três misturas de malathion e fenantreno testadas (Figura 34B e 35A).

O conteúdo total de hemoglobina após a exposição da mistura de malathion e fenantreno apresentou alterações significativas entre os controles água e solvente, sendo que o conteúdo total de hemoglobina foi maior no controle solvente. A mistura C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) não apresentou alteração significativa em relação ao controle solvente, mas apresentou um aumento significativo de 63,5% em relação ao controle água. As misturas C2 ( $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) e C3 ( $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) não apresentaram alterações significativas em relação ao controle água, porém reduções significativas de 51,3 e 62,5%, respectivamente, foram observadas em relação ao controle solvente (Figura 35B).

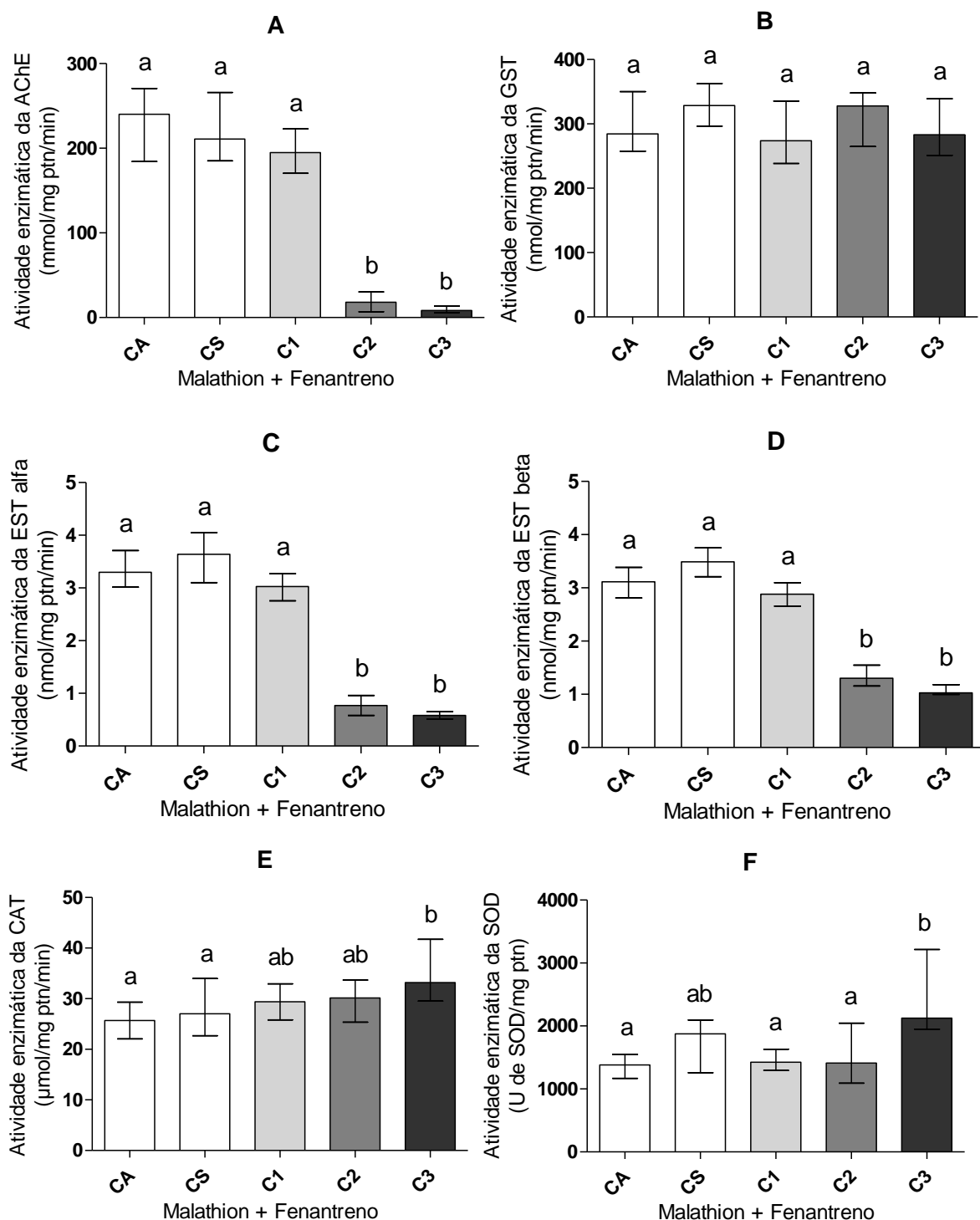


FIGURA 34: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutatona S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST -  $\alpha$ ); D - esterase beta (EST -  $\beta$ ); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn).

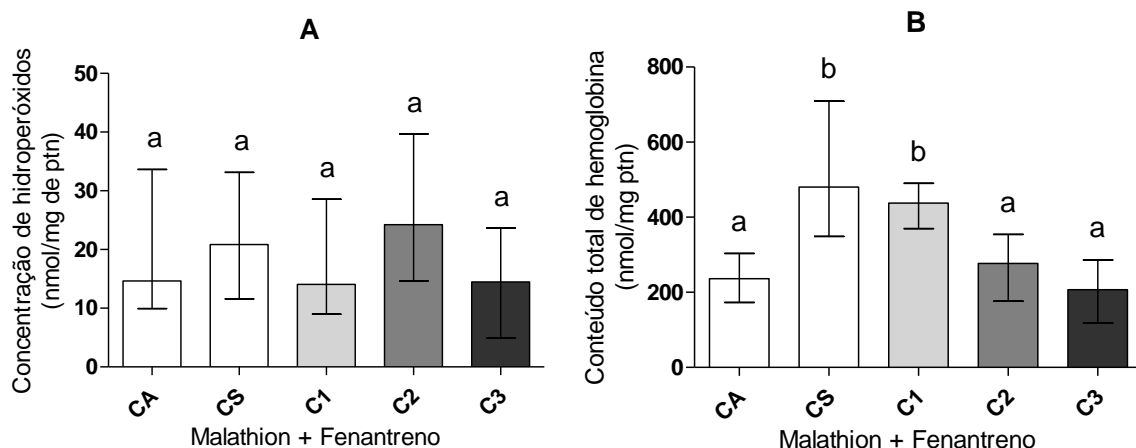


FIGURA 35: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para todos os biomarcadores bioquímicos após exposição binária de malathion e fenantreno. O componente principal 1 (PC1) explicou 39,48% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 32,98 e 15,61% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 88,07% (Figura 36). A representação gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indicam a formação de dois agrupamentos, um formado pelo controle solvente e a mistura C1 (0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e outro agrupamento formado pelas misturas C2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de malathion e fenantreno (Figura 36 A, B e C). O respectivo biplot para a análise de PC1 x PC2 indica que todos os biomarcadores bioquímicos, exceto a GST estão contribuindo para a variação dos dados tanto do PC1 quanto do PC2 (Figura 36D). Os biplot da análise de PC1 x PC3 e PC2 x PC3 indicam que a LPO, EST alfa, EST beta, AChE, CAT e o conteúdo total de Hb são responsáveis pelas variações no PC1 e PC2 e a SOD e a GST contribuem também com o PC1 e PC2, mas mais fortemente para o PC3 (Figura 36 D e E).

As informações da análise de componentes principais em conjunto indicam que existe uma similaridade entre os resultados dos biomarcadores



para a mistura C1 ( $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) e controle solvente e estes são diferenciados dos resultados para as misturas C2 ( $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) e C3 ( $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion e  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno).

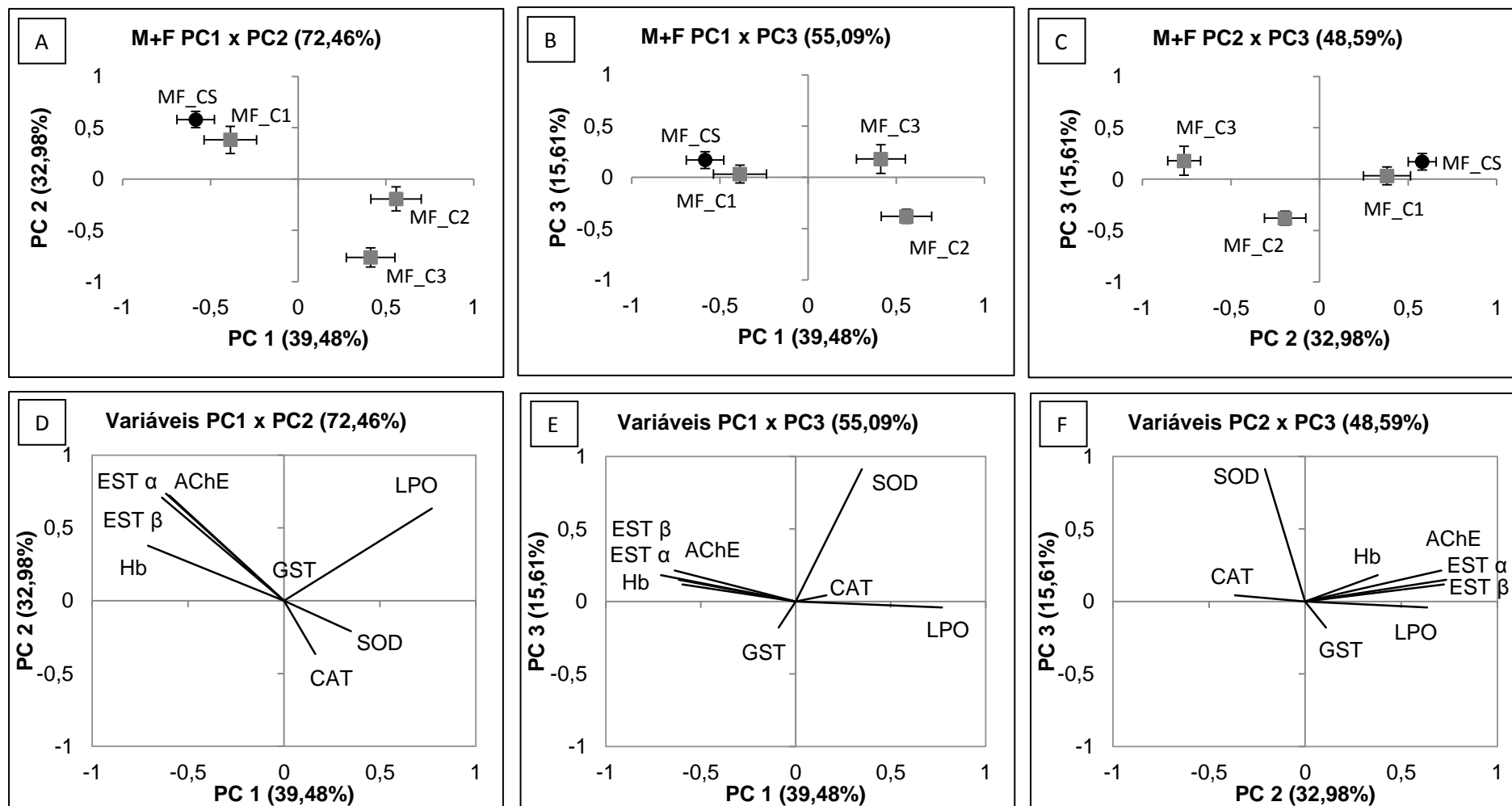


FIGURA 36: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de malathion com fenantreno e os respectivos biplots. MF\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); MF\_C1 = mistura C1 de M+F; MF\_C2 = mistura C2 de M+F; MF\_C3 = mistura C3 de M+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

## Mistura de cádmio e malathion

A mistura C1 de cádmio e malathion ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio e  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion) não alterou significativamente a atividade dos biomarcadores bioquímicos, exceto pela enzima CAT, a qual apresentou diminuições significativas de 27,4% em relação ao controle solvente (Figura 37E).

A mistura C2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio e  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion) apresentou reduções significativas de 80,0, 53,1, 70,5, 66,5, 36,5, 55,7% respectivamente na atividade das enzimas, AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT e conteúdo de Hb, quando comparadas ao controle solvente. Para esta mesma mistura foi observado aumento significativo de 77,1% na atividade da SOD e 94,5% no conteúdo de hidroperóxidos (LPO) em relação ao controle solvente (Figuras 37 e 38).

Para a mistura C3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion) foram observadas reduções significativas de 94,0, 72,3, 82,4, 70,5, 40,5% respectivamente na atividade das enzimas, AChE, GST, EST alfa, EST beta e conteúdo de Hb, quando comparadas ao controle solvente. Para esta mesma mistura foi observado aumento significativo de 195,3, 53,6 e 64,7%, respectivamente na atividade da CAT, SOD e LPO em relação ao controle solvente (Figuras 37 e 38).

A análise de componentes principais (PCA) realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição binária de cádmio e malathion indicam que o componente principal 1 (PC1) explicou 47,58% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 31,75 e 14,56% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 93,89% (Figura 39). A representação gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indicam a formação de três agrupamentos, um formado pelo controle solvente e a mistura C1 ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio e  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion), outro pela mistura C2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio e  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion) e o terceiro agrupamento a mistura C3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio e  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion) de cádmio e malathion (Figura 39 A, B e C). O respectivo biplot para a análise de PC1 x PC2 indica que todos os biomarcadores estão contribuindo

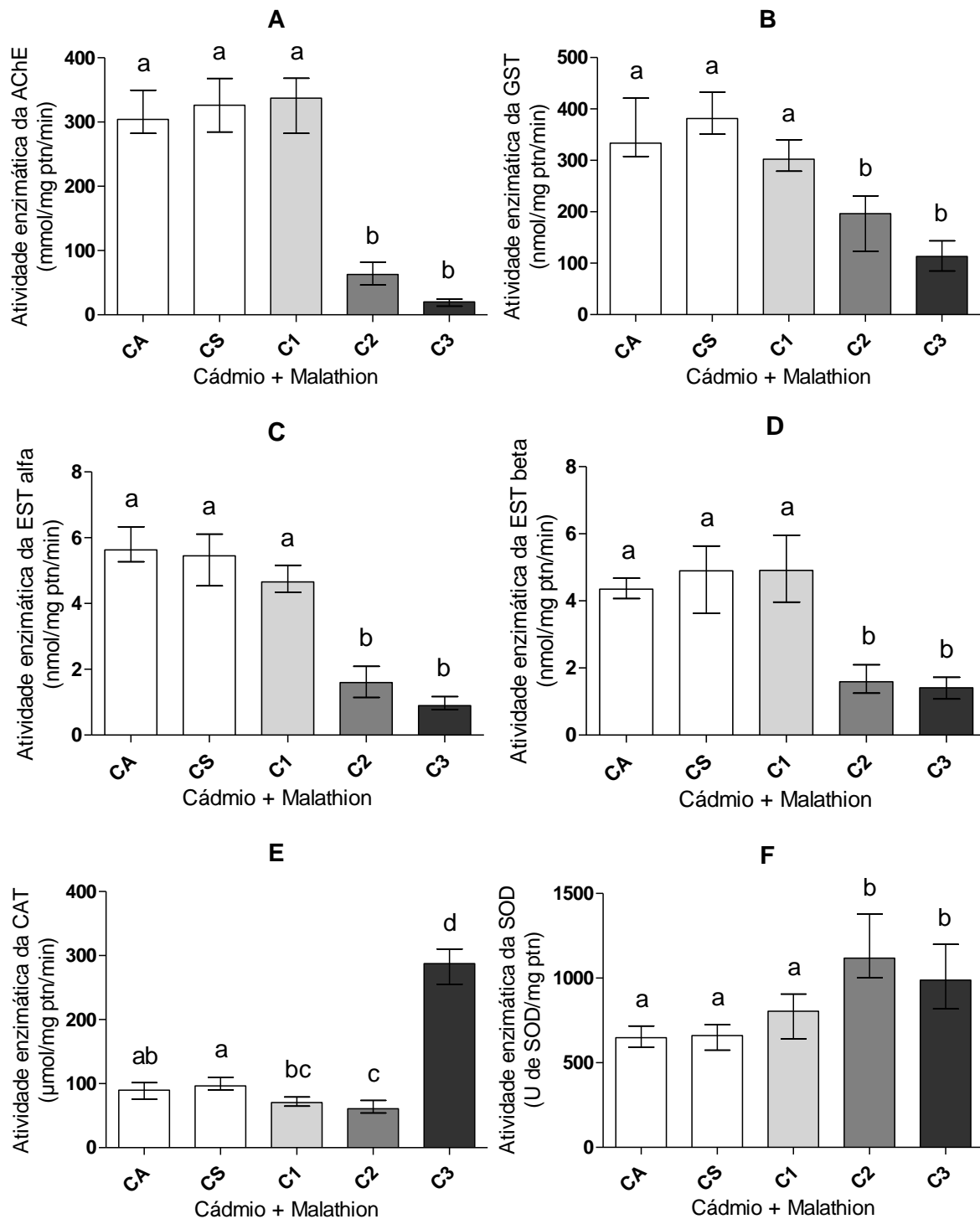


FIGURA 37: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do metal cádmio e do inseticida malathion por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutathione S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST - α); D - esterase beta (EST - β); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

para a variação dos dados, sendo que a LPO e a CAT também contribuem para as variações PC2 (Figura 39D). Os biplot da análise de PC1 x PC3 e PC2 x PC3 indicam que todos os biomarcadores são responsáveis pelas variações no PC3 (Figura 39 E e F).

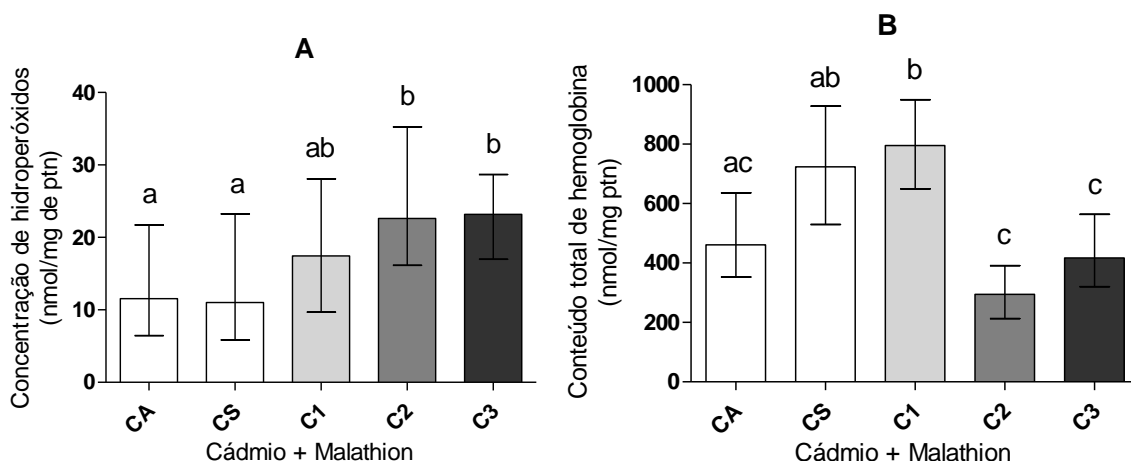


FIGURA 38: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticarioli* expostos à mistura do metal cádmio e do inseticida malathion por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

Reunindo todas as informações da análise de componentes principais é possível detectar que todos os biomarcadores bioquímicos analisados geraram as diferenças encontradas entre os tratamentos da mistura de cádmio e malathion. Tais resultados são corroborados pelas quantificações das atividades enzimáticas, as quais geraram alterações bioquímicas significativas nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio e 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio e 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion) dos poluentes em questão.

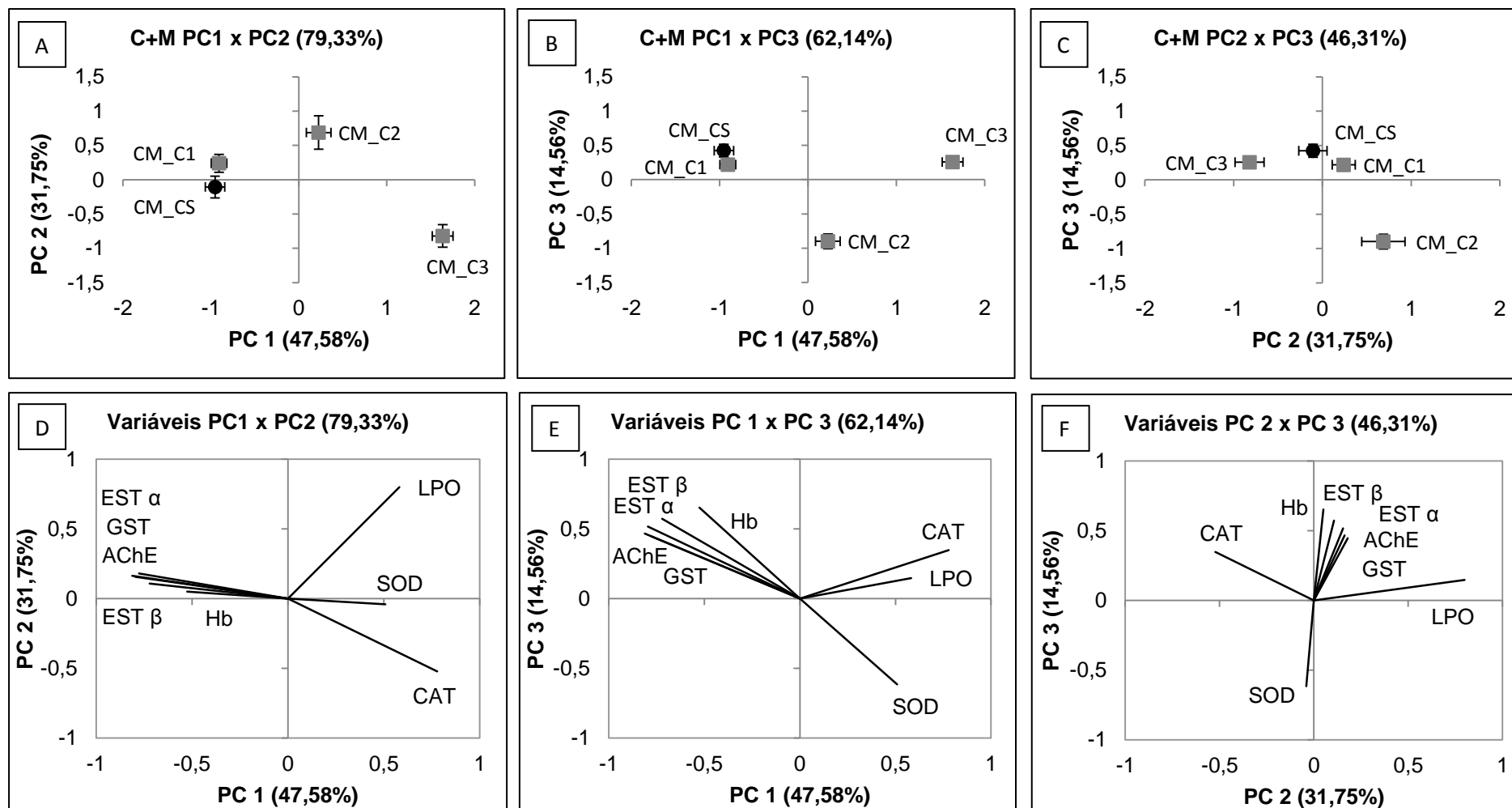


FIGURA 39: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de cádmio com malathion e os respectivos biplots. CM\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); CM\_C1 = mistura C1 de C+M; CM\_C2 = mistura C2 de C+M; CM\_C3 = mistura C3 de C+M (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Mistura de cádmio e fenantreno

As larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas à mistura C1 de cádmio e fenantreno ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) apresentaram alteração apenas da enzima GST, com aumento significativo de 25,9% em relação ao controle solvente (Figura 40B)

Para a mistura C2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) foram observados reduções significativas na atividade enzimática da AChE e no conteúdo de Hb de respectivamente, 41,5 e 73,2% em relação ao controle solvente. Nessa mesma mistura foram observados aumentos significativos de 46,6, 54,0, 74,2 e 39,2% respectivamente na atividade das enzimas GST, LPO, SOD e CAT quando comparadas ao controle solvente (Figuras 40 e 41).

Na mistura C3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) foram observados reduções significativas na atividade enzimática da AChE, EST beta e no conteúdo de Hb de respectivamente, 34,1, 17,0 e 70,2% em relação ao controle solvente. Nessa mesma mistura foram observados aumentos significativos de 39,6, 51,6, 153,5 e 90,4% respectivamente na atividade das enzimas GST, LPO, SOD e CAT quando comparadas ao controle solvente (Figuras 40 e 41).

A análise de componentes principais (PCA) realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição binária de cádmio e fenantreno indicam que o componente principal 1 (PC1) explicou 58,75% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 19,51 e 10,70% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 88,96% (Figura 42). A representação gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indicam a formação de dois agrupamentos, um formado pelo controle solvente e a mistura C1 ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) e outro agrupamento formado pela mistura C2 ( $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) e C3 ( $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  de fenantreno) de cádmio e fenantreno (Figura 42 A e B). O respectivo biplot para a análise de PC1 x PC2 indica que a atividade das enzimas CAT, GST, SOD e conteúdo total de

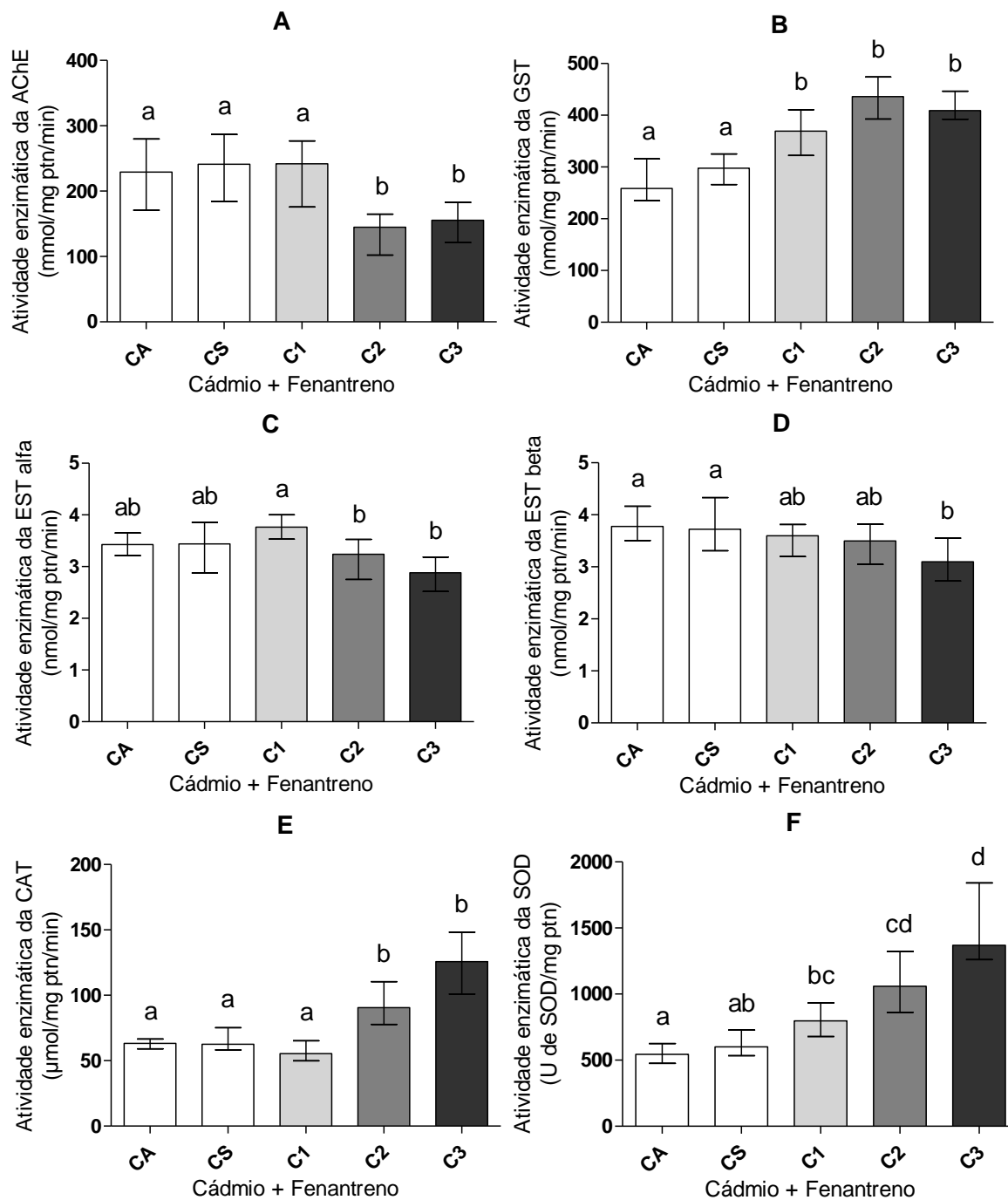


FIGURA 40: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticarioli* expostos à mistura do metal cádmio e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutatona S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST - α); D - esterase beta (EST - β); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)



Hb contribuem para a variação dos dados no PC1, a AChE, EST alfa e EST beta contribuem para ambos componentes e a LPO contribui para a variação no PC2 (Figura 42D). Os biplot da análise de PC1 x PC3 e PC2 x PC3 indicam que a AChE, EST alfa, EST beta e conteúdo de Hb contribuem para o PC3 (Figura 42 E e F).

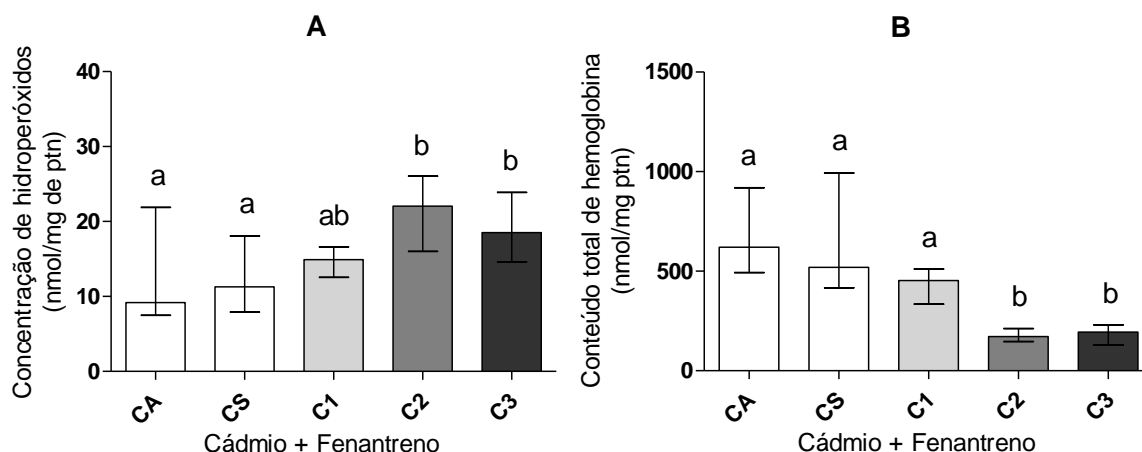


FIGURA 41: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticarioli* expostos à mistura do metal cádmio e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

Os biomarcadores que explicam a maior porcentagem de variação entre os dois agrupamentos formados foram os mais alterados na exposição de cádmio e fenantreno, corroborando a similaridade das respostas da mistura C1 (0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e o controle solvente e a similaridade entre a mistura C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de cádmio e fenantreno.

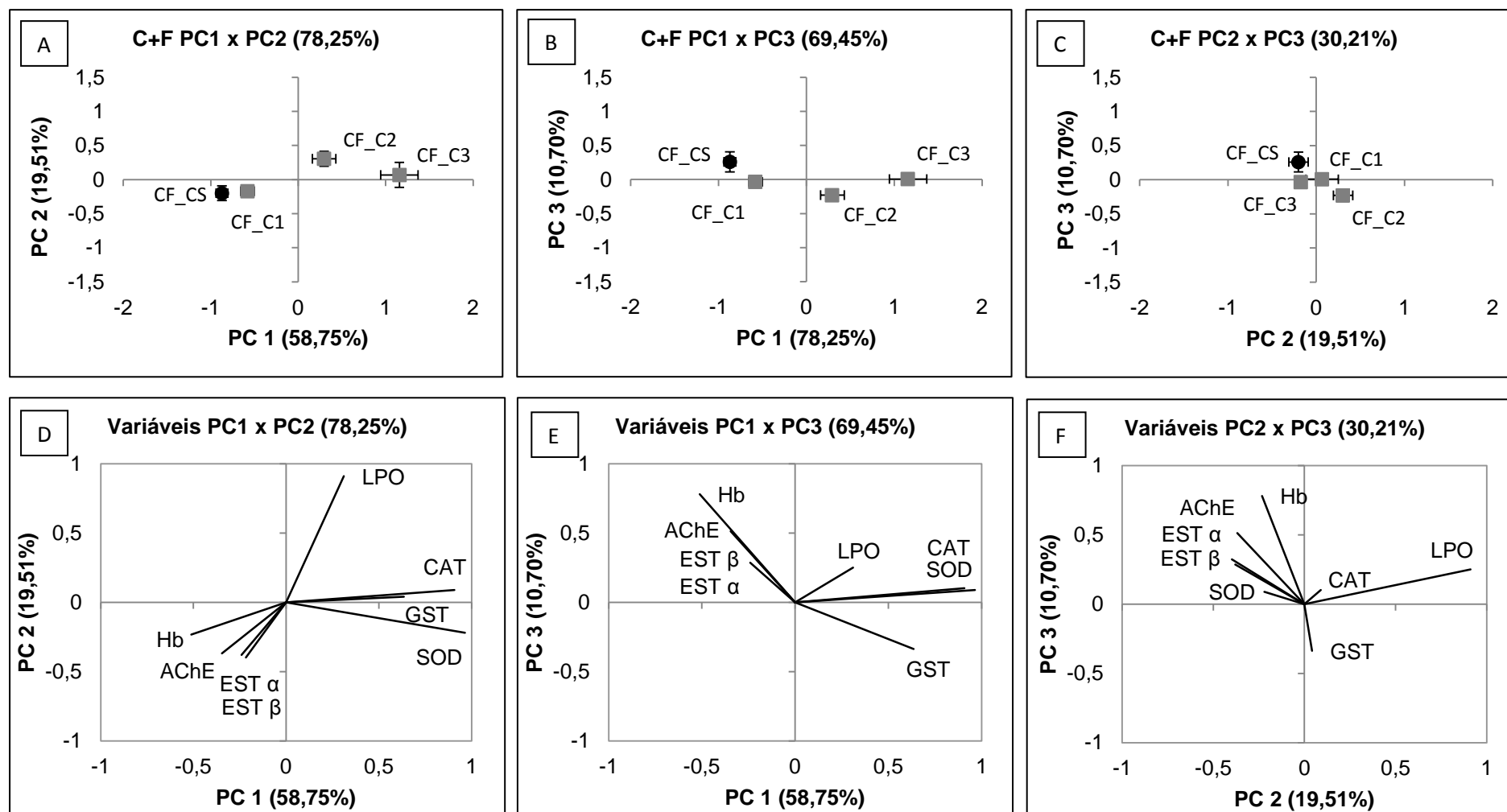


FIGURA 42: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de cádmio com fenantreno e os respectivos biplots. CF\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); CF\_C1 = mistura C1 de C+F; CF\_C2 = mistura C2 de C+F; CF\_C3 = mistura C3 de C+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Mistura de cádmio, malathion e fenantreno

As larvas de *Chironomus sancticaroli* não sofreram alterações bioquímicas após exposição da mistura C1 (0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio, 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de cádmio, malathion e fenantreno em relação aos controles água e solvente (Figuras 43 e 44).

Na mistura C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio, 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) foram observadas reduções significativas na atividade das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta e conteúdo de Hb respectivamente de, 72,3, 61,5, 73,0, 54,4, 77,3% em relação ao controle solvente. Nessa mesma mistura foram observados aumentos significativos na atividade da enzima CAT e na LPO, respectivamente de 32,6 e 59,1% em relação ao controle solvente. A atividade da enzima SOD também apresentou aumentos significativos de 20,2% nessa mesma mistura, porém em relação ao controle água (Figuras 43 e 44).

Na exposição terciária C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio, 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) foram observadas reduções significativas na atividade das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, SOD e conteúdo de Hb respectivamente de, 97,2, 66,0, 84,3, 58,1, 25,0, 58,5% em relação ao controle solvente. Nessa mesma mistura foram observados aumentos significativos na atividade da enzima CAT e na LPO, respectivamente de 23,4 e 50,8% em relação ao controle solvente (Figuras 43 e 44).

A análise de componentes principais (PCA) realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição terciária de cádmio, malathion e fenantreno indicam que o componente principal 1 (PC1) explicou 56,30% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 22,74 e 8,09% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 87,13% (Figura 45). A representação gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indicam a formação de dois agrupamentos, um formado pelo controle solvente e a mistura C1 e outro agrupamento formado pela mistura C2 e C3 de cádmio, malathion e fenantreno (Figura 45 A, B e C).

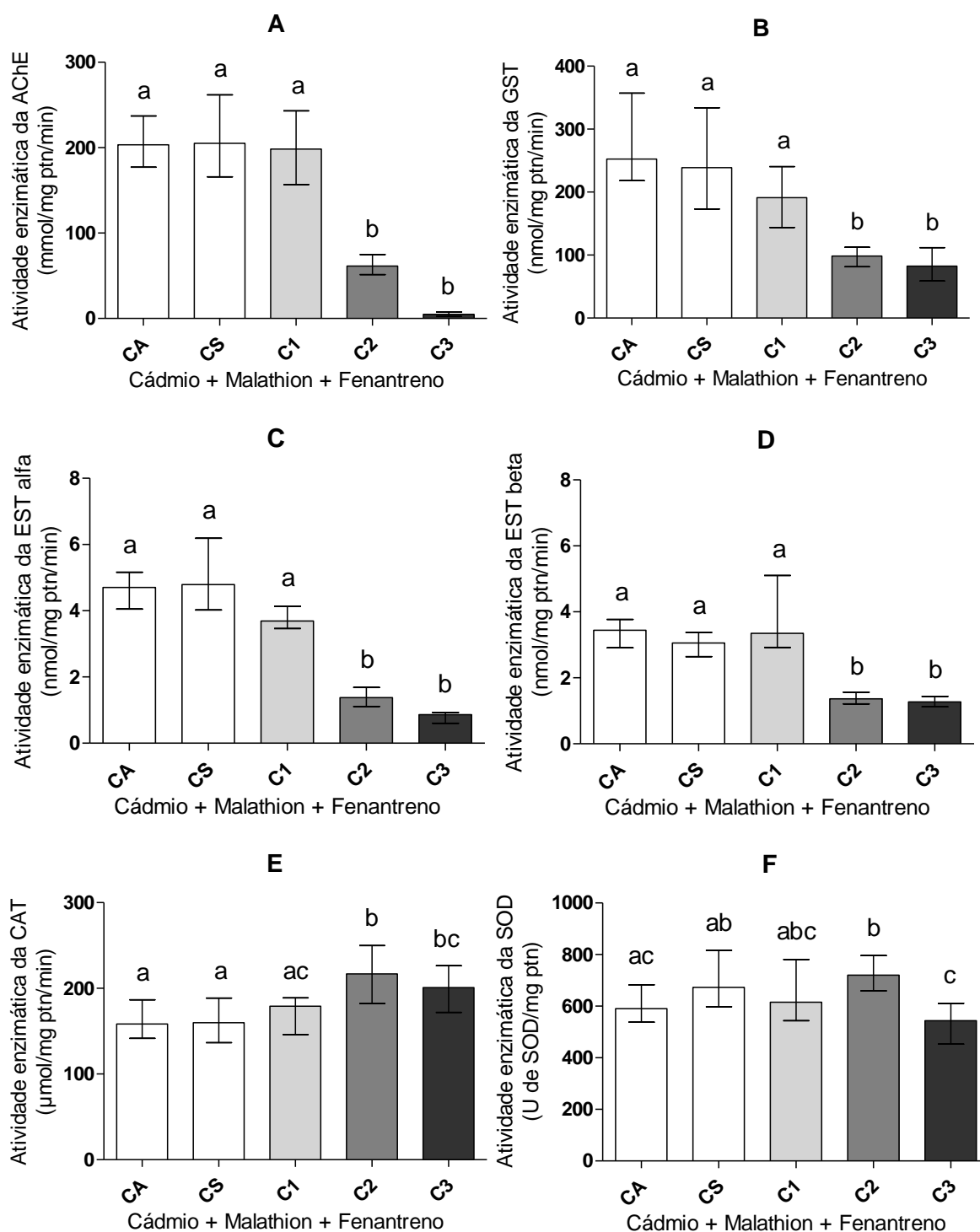


FIGURA 43: Biomarcadores bioquímicos em *Chironomus sancticarloi* expostos à mistura do metal cádmio, do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenanthreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenanthreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenanthreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenanthreno). A - acetilcolinesterase (AChE); B - glutatona S-transferase (GST); C - esterase alfa (EST - α); D - esterase beta (EST - β); E - catalase (CAT); F - superóxido dismutase (SOD). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

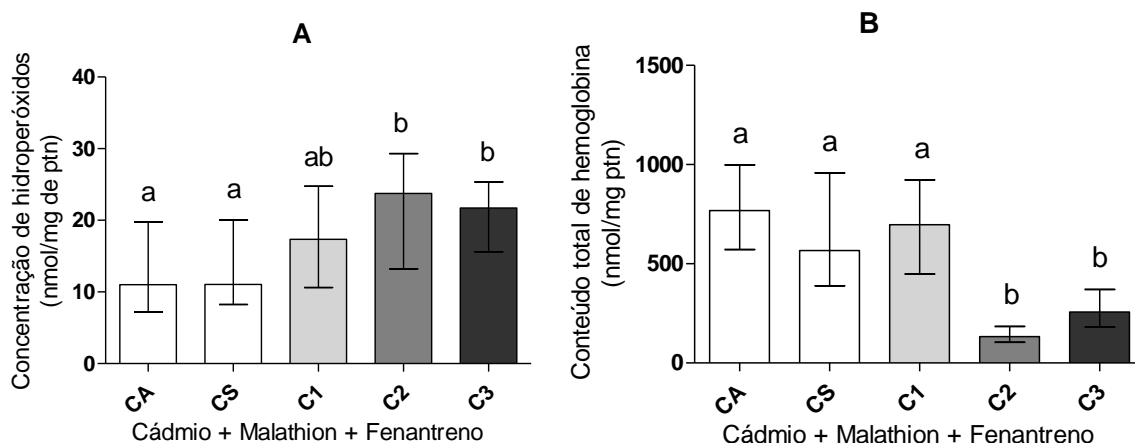


FIGURA 44: Peroxidação Lipídica (A) e Conteúdo total de hemoglobina (B) em *Chironomus sancticaroli* expostos à mistura do metal cádmio, do inseticida malathion e do hidrocarboneto fenantreno por 48h (CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno). Os resultados expressam mediana e intervalo interquartil (n = 20 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando Kruskal-Wallis e os contrastes de Dunn)

O respectivo biplot para a análise de PC1 x PC2 indica que todos os biomarcadores estão contribuindo para a variação dos dados, sendo que a LPO também contribui para as variações no PC2 (Figura 45D). Os biplot da análise de PC1 x PC3 e PC2 x PC3 indicam que a SOD e a CAT contribuem mais para as variações no PC3 (Figura 45 E e F).

Todos os biomarcadores bioquímicos explicam a maior porcentagem de variação entre os dois agrupamentos formados. Este resultado vem a corroborar as alterações bioquímicas observadas em todos os biomarcadores nessa exposição terciária dos poluentes, indicando a similaridade das respostas da mistura C1 (0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio, 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e o controle solvente e a similaridade entre a mistura C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio, 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio, 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion e 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de cádmio, malathion e fenantreno.

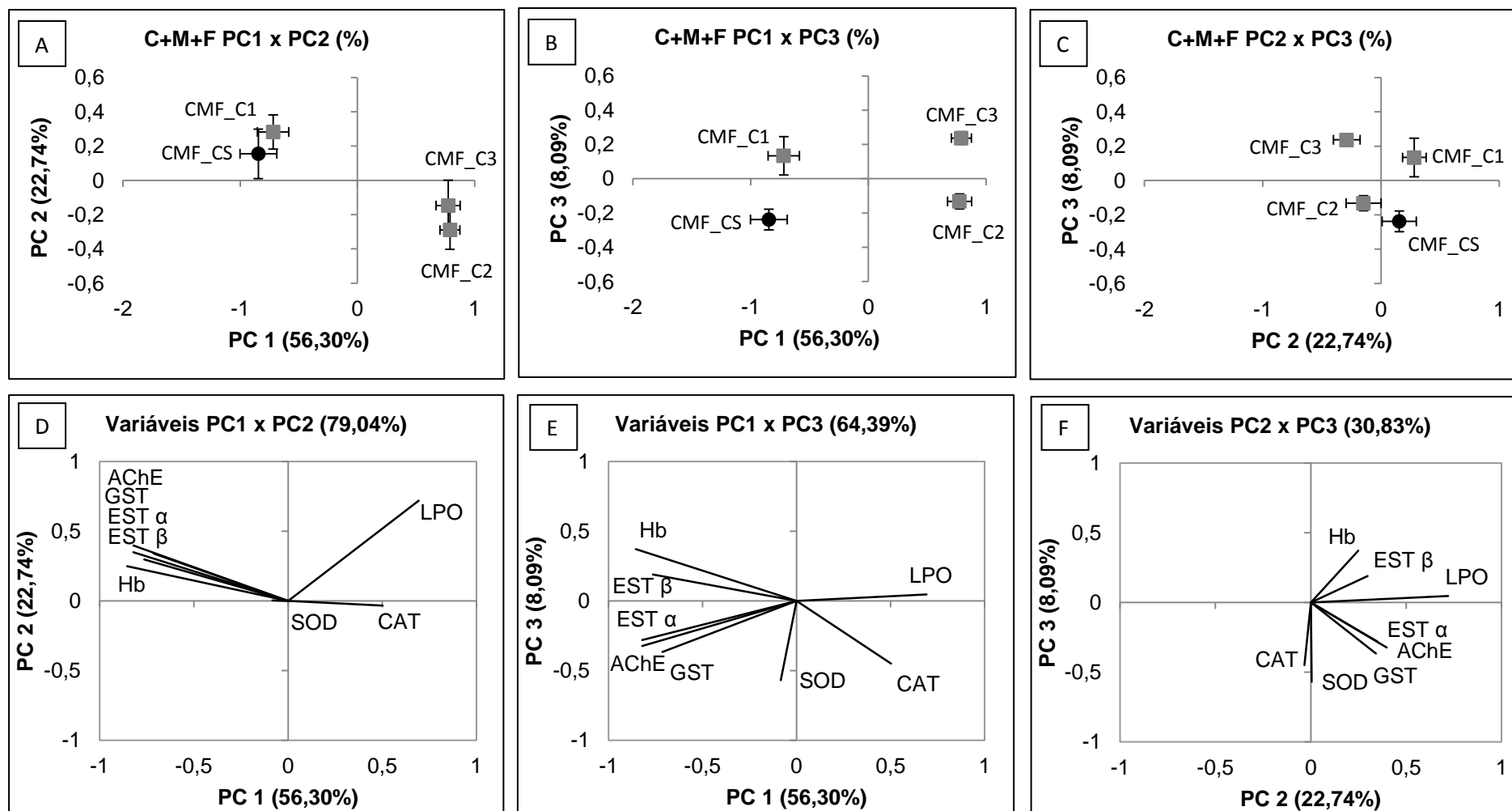


FIGURA 45: Análise dos componentes principais (PCA) dos biomarcadores após exposição à mistura de cádmio, malathion e fenantreno e os respectivos biplots. CMF\_CS = controle solvente (símbolo redondo preto); CMF\_C1 = mistura C1 de C+M+F; CMF\_C2 = mistura C2 de C+M+F; CMF\_C3 = mistura C3 de C+M+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Comparação malathion / fenantreno / malathion + fenantreno

Quando comparados os efeitos no metabolismo das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao inseticida malathion e ao hidrocarboneto fenantreno de formas isoladas com a exposição binária desses dois poluentes, foi possível observar maiores alterações nos biomarcadores bioquímicos de indivíduos expostos à mistura dos xenobióticos.

Reduções mais expressivas foram observadas na atividade das enzimas AChE, EST alfa, EST beta e no conteúdo total de hemoglobina nas misturas C2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos dois poluentes. Já a enzima CAT apresentou aumento da atividade na mistura C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos dois poluentes quando comparadas as exposições de malathion e fenantreno de forma isolada (Tabela 8).

As exposições ao malathion e a mistura binária (malathion + fenantreno) não apresentaram alterações na atividade da enzima GST. Portanto, efeitos na atividade dessa enzima foram visualizados apenas na exposição ao fenantreno, a qual reduziu significativamente a atividade da enzima nas três concentrações testadas (Tabela 8).

A exposição individual ao malathion mostrou maiores efeitos na atividade da enzima SOD e de danos de peroxidação lipídica quando comparada às exposições ao fenantreno e a mistura binária (malathion + fenantreno) (Tabela 8).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição ao malathion, fenantreno e mistura binária de malathion e fenantreno para se buscar padrões de respostas entre essas três exposições. O componente principal 1 (PC1) explicou 38,53% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 24,43 e 15,18% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 78,14% (Figura 46). A representação gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indicam a formação de dois agrupamentos, um

formado pelos três controles solvente, a concentração C1 de malathion, as três concentrações de fenantreno e a mistura C1 de malathion e fenantreno e outro agrupamento formado pelas concentrações C2 e C3 de malathion e as misturas C2 e C3 de malathion e fenantreno (Figura 46 A, B e C). O respectivo biplot para a análise de PC1 x PC2 indica que a AChE, EST alfa, EST beta, LPO e conteúdo total de Hb são os biomarcadores que estão contribuindo para a maior parte da variação dos dados, tanto no PC1 quanto no PC2 (Figura 46D). A SOD é a enzima que está contribuindo com a maior parte da variação dos dados no PC3 (Figura 46 E e F).

Juntando todas as informações da análise de componentes principais é possível perceber que os controles solventes tiveram respostas semelhantes entre as três exposições. Além disso, as concentrações C2 e C3 de fenantreno se agruparam com as concentrações/misturas C1 e controles, indicando similaridade de respostas. Portanto, o fenantreno contribuiu menos que o malathion nos efeitos gerados na mistura binária, já que as concentrações C2 e C3 de malathion e as misturas C2 e C3 de malathion e fenantreno tiveram respostas similares.



TABELA 9: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao malathion, fenantreno e a mistura de malathion e fenantreno. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno

		Malathion (%)			Fenantreno (%)			Malathion + Fenantreno (%)		
		0,0001 mg L <sup>-1</sup>	0,0564 mg L <sup>-1</sup>	0,1006 mg L <sup>-1</sup>	0,0025 mg L <sup>-1</sup>	1,25 mg L <sup>-1</sup>	2,44 mg L <sup>-1</sup>	C1	C2	C3
AChE	CA	28,5	<b>-74,7*</b>	<b>-83,6*</b>	-6,2	-0,7	<b>-29,6*</b>	-14,3	<b>-92,1*</b>	<b>-95,4*</b>
	CS	23,6	<b>-75,6*</b>	<b>-84,2*</b>	0,9	6,8	<b>-24,3*</b>	-10,7	<b>-91,7*</b>	<b>-95,2*</b>
GST	CA	-27,0	-10,6	-21,8	<b>-26,9*</b>	<b>-23,5*</b>	<b>-25,9*</b>	-4,7	7,3	-0,8
	CS	-9,3	11,1	-2,9	<b>-24,3*</b>	<b>-20,8*</b>	<b>-23,3*</b>	-13,9	-3,0	-10,4
EST alfa	CA	<b>40,0*</b>	<b>-57,4*</b>	<b>-71,4*</b>	-6,7	<b>-15,8*</b>	<b>-21,9*</b>	-9,8	<b>-75,8*</b>	<b>-82,7*</b>
	CS	28,1	<b>-61,0*</b>	<b>-73,8*</b>	-3,7	<b>-13,2*</b>	<b>-19,4*</b>	-16,1	<b>-77,5*</b>	<b>-84,0*</b>
EST beta	CA	23,8	<b>-47,3*</b>	<b>-57,4*</b>	<b>-17,8*</b>	<b>-15,5*</b>	<b>-16,4*</b>	-8,3	<b>-56,6*</b>	<b>-65,6*</b>
	CS	17,2	<b>-50,1*</b>	<b>-59,7*</b>	<b>-15,4*</b>	<b>-13,0*</b>	<b>-13,9*</b>	-16,6	<b>-60,5*</b>	<b>-68,7*</b>
CAT	CA	<b>23,6*</b>	9,6	2,3	-21,7	-18,2	-19,7	12,3	17,1	<b>47,6*</b>
	CS	6,7	-5,4	-11,6	-9,4	-5,3	-7,0	-3,1	1,0	<b>27,3*</b>
SOD	CA	<b>178,4*</b>	<b>64,2*</b>	<b>113,9*</b>	-12,5	7,2	<b>37,6*</b>	23,1	14,6	<b>91,5*</b>
	CS	<b>68,1*</b>	-0,8	29,1	<b>-41,8*</b>	<b>-28,7*</b>	-8,5	-8,0	-14,4	43,1
LPO	CA	-16,2	48,0	<b>77,8*</b>	-15,6	-17,4	-19,7	-0,7	34,3	-17,4
	CS	-26,9	28,9	<b>54,9*</b>	-12,5	-14,4	-16,7	1,0	36,7	-15,9
Hb	CA	24,6	-23,9	2,5	<b>-35,7*</b>	-8,7	<b>-53,1*</b>	<b>63,5*</b>	1,7	-21,6
	CS	23,0	-24,9	1,1	-20,5	12,9	<b>-42,1*</b>	-21,8	<b>-51,3*</b>	<b>-62,5*</b>

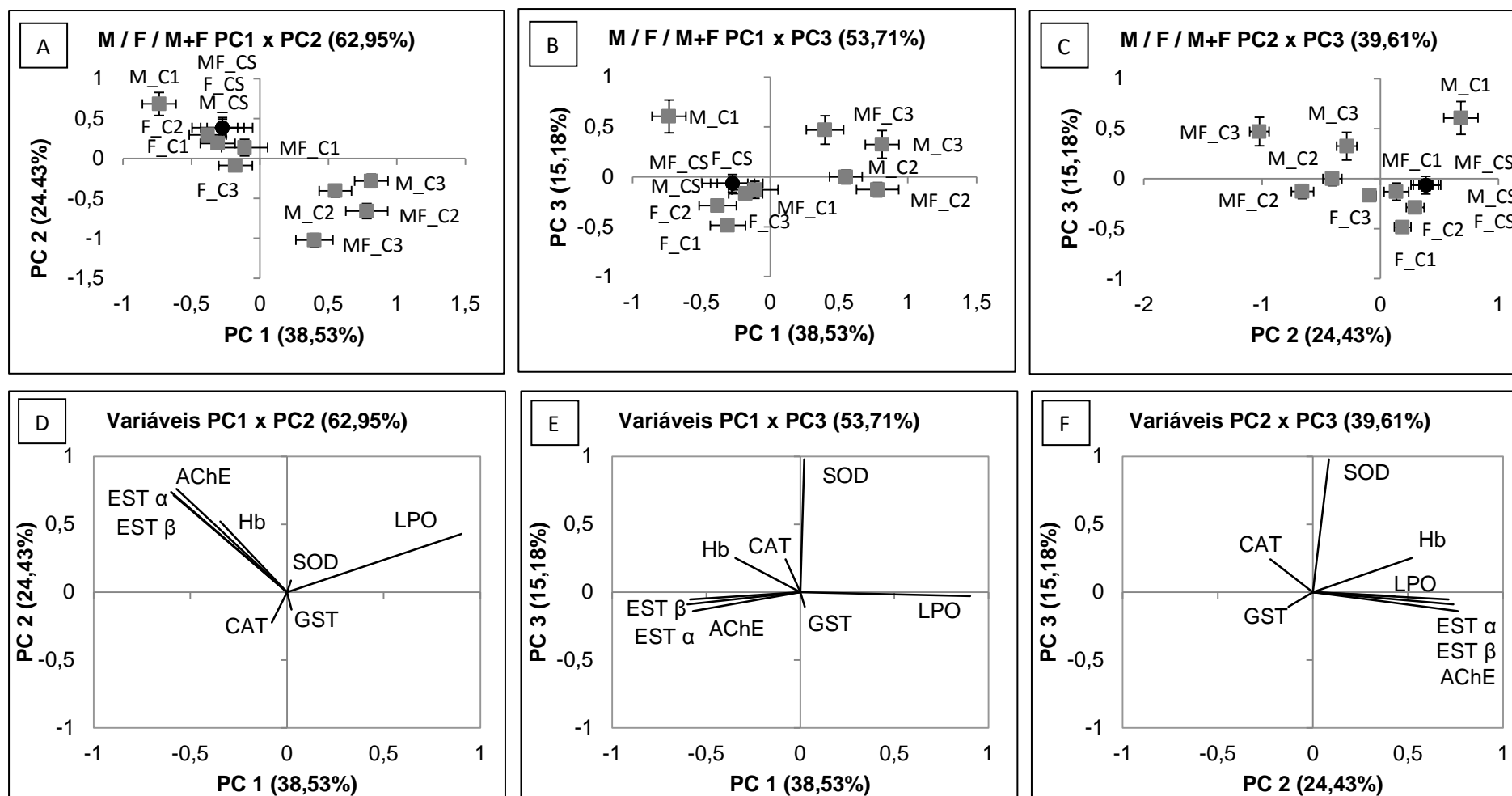


FIGURA 46: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao malathion, fenantreno e mistura binária de malathion e fenantreno. M\_CS / F\_CS / MF\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion; F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno; MF\_C1 = mistura C1 de M+F; MF\_C2 = mistura C2 de M+F; MF\_C3 = mistura C3 de M+F (símbolo quadro cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Comparação cádmio / malathion / cádmio + malathion

Quando comparados os efeitos no metabolismo das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao metal cádmio e ao inseticida malathion de formas isoladas com a exposição binária desses dois poluentes, foi possível observar maiores efeitos nos biomarcadores bioquímicos dos indivíduos expostos a mistura dos xenobióticos.

Reduções mais expressivas foram observadas na atividade das enzimas AChE, EST alfa, EST beta e GST nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion) dos dois poluentes. Já a enzima CAT e a LPO apresentaram aumentos na mistura C3 e nas misturas C2 e C3, respectivamente, dos dois poluentes quando comparadas as exposições de cádmio e de malathion de forma isolada (Tabela 9).

A exposição individual ao malathion mostrou maiores efeitos na enzima SOD nas três concentrações quando comparada as exposições cádmio e a mistura binária (cádmio + malathion). Já a exposição ao cádmio apresentou maiores reduções no conteúdo total de Hb nas concentrações C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup>) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup>) quando comparada as exposições de malathion e a mistura binária (Tabela 9).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição ao cádmio, malathion e mistura binária de cádmio e malathion. O componente principal 1 (PC1) explicou 39,22% da variação enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 23,85 e 13,20% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 76,27% (Figura 47). A representação gráfica dos escores do PC1 e PC2 indica a formação de três agrupamentos, um formado pelos três controles e as concentrações C1 de todos os experimentos, outro agrupamento formado por todas as concentrações C2 e C3 dos três experimentos, com exceção da mistura C3 de cádmio e malathion, a qual ficou isolada formando o terceiro agrupamento (Figura 47A). Já a representação

gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indica o agrupamento de todos os tratamentos, exceto a mistura C3 de cádmio e malathion (Figura 47 B e C).

Analisando todas as informações em conjunto da análise de componentes principais foi possível distinguir que existe um padrão nas respostas bioquímicas avaliadas. Os controles dos três experimentos tiveram uma resposta semelhante, juntamente com a concentração C1 de todos os experimentos, assim como as concentrações C2 e C3 das três exposições também apresentaram semelhanças nas respostas. Apenas a concentração C3 de cádmio e malathion formou um agrupamento isolado, indicando o quanto esse tratamento apresentou alterações de respostas bioquímicas quando comparado com todos os outros tratamentos.

TABELA 10: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion e a mistura de cádmio e malathion. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 =  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion; C2 =  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,0564 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion; C3 =  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cádmio +  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$  de malathion

		Cádmio (%)			Malathion (%)			Cádmio + Malathion (%)		
		$0,001 \text{ mg L}^{-1}$	$3,2 \text{ mg L}^{-1}$	$7,4 \text{ mg L}^{-1}$	$0,0001 \text{ mg L}^{-1}$	$0,0564 \text{ mg L}^{-1}$	$0,1006 \text{ mg L}^{-1}$	C1	C2	C3
AChE	CA	-5,7	<b>-35,9*</b>	<b>-34,9*</b>	28,5	<b>-74,7*</b>	<b>-83,6*</b>	7,1	<b>-78,4*</b>	<b>-93,5*</b>
	CS	-	-	-	23,6	<b>-75,6*</b>	<b>-84,2*</b>	-0,8	<b>-80,0*</b>	<b>-94,0*</b>
GST	CA	-16,2	<b>-35,8*</b>	<b>-45,3*</b>	-27,0	-10,6	-21,8	-13,0	<b>-48,2*</b>	<b>-69,4*</b>
	CS	-	-	-	-9,3	11,1	-2,9	-21,3	<b>-53,1*</b>	<b>-72,3*</b>
EST alfa	CA	-16,4	<b>-44,1*</b>	<b>-29,0*</b>	<b>40,0*</b>	<b>-57,4*</b>	<b>-71,4*</b>	-15,1	<b>-71,7*</b>	<b>-83,1*</b>
	CS	-	-	-	28,1	<b>-61,0*</b>	<b>-73,8*</b>	-11,6	<b>-70,5*</b>	<b>-82,4*</b>
EST beta	CA	16,1	<b>-25,4*</b>	-0,8	23,8	<b>-47,3*</b>	<b>-57,4*</b>	18,3	<b>-61,8*</b>	<b>-66,4*</b>
	CS	-	-	-	17,2	<b>-50,1*</b>	<b>-59,7*</b>	3,7	<b>-66,5*</b>	<b>-70,5*</b>
CAT	CA	<b>-18,7*</b>	9,5	13,5	<b>23,6*</b>	9,6	2,3	<b>-19,5*</b>	<b>-29,6*</b>	<b>227,3*</b>
	CS	-	-	-	6,7	-5,4	-11,6	<b>-27,4*</b>	<b>-36,5*</b>	<b>195,3*</b>
SOD	CA	8,0	<b>41,3*</b>	<b>22,3*</b>	<b>178,4*</b>	<b>64,2*</b>	<b>113,9*</b>	19,0	<b>78,0*</b>	<b>54,4*</b>
	CS	-	-	-	<b>68,1*</b>	-0,8	29,1	18,4	<b>77,1*</b>	<b>53,6*</b>
LPO	CA	-0,3	-5,5	-3,7	-16,2	48,0	<b>77,8*</b>	31,3	<b>102,0*</b>	<b>71,1*</b>
	CS	-	-	-	-26,9	28,9	<b>54,9*</b>	26,4	<b>94,5*</b>	<b>64,7*</b>
Hb	CA	2,9	<b>-69,8*</b>	<b>-60,0*</b>	24,6	-23,9	2,5	<b>63,5*</b>	-31,9	-8,5
	CS	-	-	-	23,0	-24,9	1,1	6,3	<b>-55,7*</b>	<b>-40,5*</b>

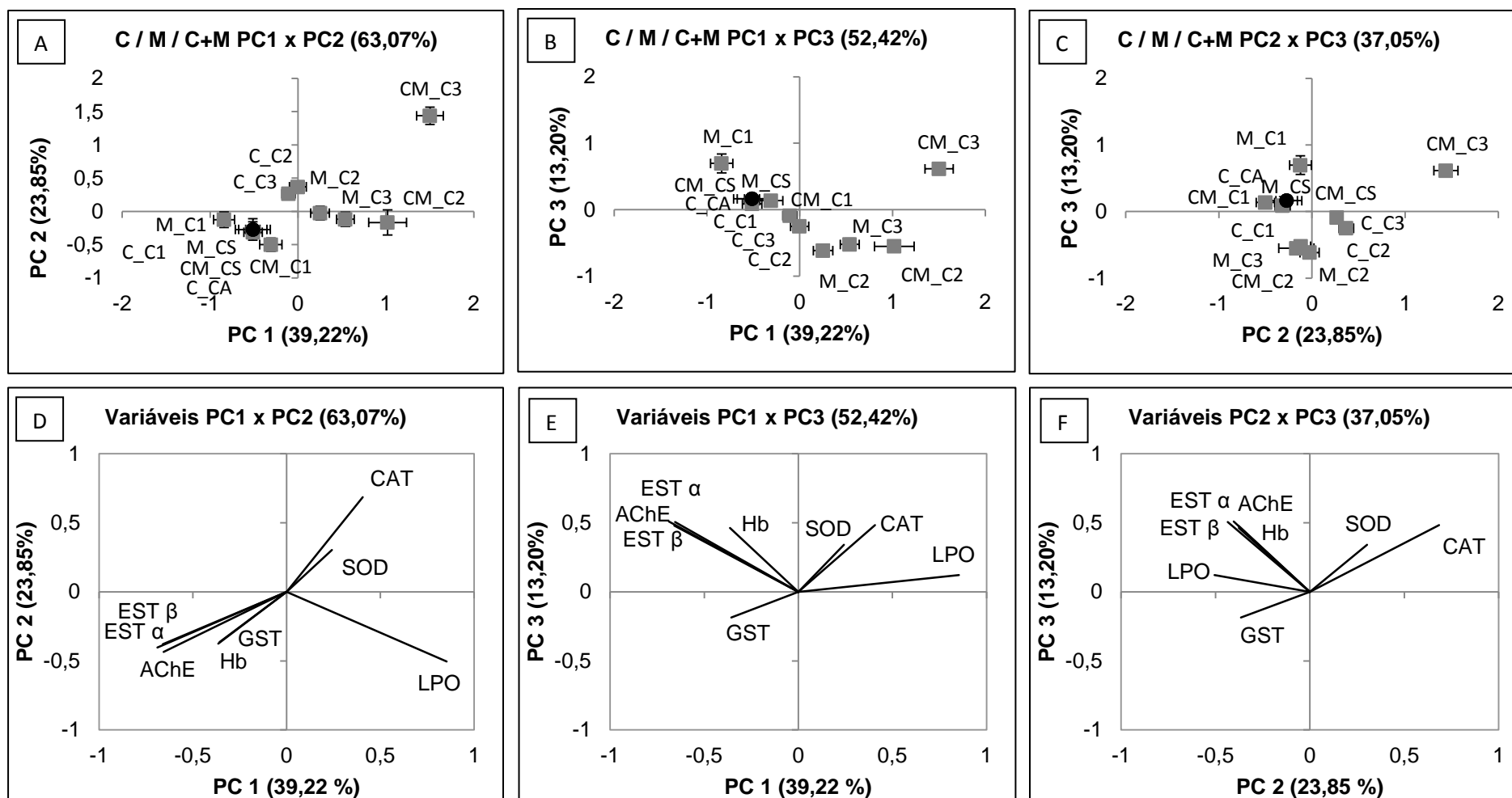


FIGURA 47: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao cádmio, malathion e mistura binária de cádmio e malathion. C\_CA = controle água; M\_CS / CM\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio; M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion; CM\_C1 = mistura C1 de C+M; CM\_C2 = mistura C2 de C+M; CM\_C3 = mistura C3 de C+M (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Comparação cádmio / fenantreno / cádmio + fenantreno

Quando comparados os efeitos no metabolismo das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao metal cádmio e ao hidrocarboneto fenantreno de formas isoladas com a exposição binária desses dois poluentes, foi possível observar maiores efeitos nos biomarcadores bioquímicos de indivíduos expostos a mistura dos xenobióticos.

Reduções mais expressivas foram observadas no conteúdo total de Hb nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos dois poluentes. Já as atividades das enzimas GST, CAT, SOD e a LPO apresentaram aumentos nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos dois poluentes quando comparadas as exposições de cádmio e fenantreno de forma isolada (Tabela 10).

Foram observadas reduções para as atividades das enzimas EST alfa, EST beta e GST nas concentrações C2 e C3 nas exposições de cádmio (3,2 mg L<sup>-1</sup> e 7,4 mg L<sup>-1</sup>) e fenantreno (1,25 mg L<sup>-1</sup> e 2,44 mg L<sup>-1</sup>) de forma isoladas. Quando comparadas as mesmas atividades enzimáticas mensuradas na exposição binária dos poluentes a GST teve um aumento, a EST alfa não foi afetada e a EST beta apresentou redução apenas na mistura C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) (Tabela 10).

A atividade da enzima AChE apresentou efeitos semelhantes entre as três exposições, sendo inibida nas concentrações C2 e C3 de cádmio (3,2 mg L<sup>-1</sup> e 7,4 mg L<sup>-1</sup>), concentração C3 de fenantreno (2,44 mg L<sup>-1</sup>) e nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de cádmio e fenantreno (Tabela 10).

A análise de componentes principais (PCA) realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição ao cádmio, fenantreno e mistura binária de cádmio e fenantreno indicou que o componente principal 1 (PC1) explicou 47,31% da variação dos dados enquanto que os componentes

principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 23,08 e 14,53% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 84,92% (Figura 48).

A representação gráfica dos escores do PC1 e PC2 indica a formação de um grande agrupamento formado pelos controles e a maioria dos tratamentos, ficando a mistura C2 de cádmio e fenantreno mais separada desse grande grupo e a mistura C3 de cádmio e fenantreno isolada de todos os tratamentos (Figura 48A). Quando se analisou o PC3 x PC1 ainda foi possível visualizar a separação das misturas C2 e C3 de cádmio e fenantreno de todos os outros tratamentos (Figura 48B). Entretanto na análise de PC2 x PC3 todos os tratamentos ficam agrupados (Figura 48C).

As atividades enzimáticas que explicam as variações encontradas no PC1 foram AChE, CAT, GST, SOD, o conteúdo total de Hb e parte pela LPO, a qual explica mais as variações no PC2 (Figura 48D). Como em conjunto o PC1 e PC2 somam 70% da variação encontrada, essas enzimas que explicam as variações são as que apresentam maior relevância nas análises. Estes dados são corroborados quando são observadas as alterações bioquímicas na tabela 10, a qual indica maiores alterações dessas enzimas nas exposições das misturas C2 e C3 de cádmio e fenantreno.



TABELA 11: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, fenantreno, e a mistura de cádmio e fenantreno. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno

		Cádmio (%)			Fenantreno (%)			Cádmio + Fenantreno (%)		
		0,001 mg L <sup>-1</sup>	3,2 mg L <sup>-1</sup>	7,4 mg L <sup>-1</sup>	0,0025 mg L <sup>-1</sup>	1,25 mg L <sup>-1</sup>	2,44 mg L <sup>-1</sup>	C1	C2	C3
AChE	CA	-5,7	<b>-35,9*</b>	<b>-34,9*</b>	-6,2	-0,7	<b>-29,6*</b>	0,8	<b>-38,8*</b>	<b>-31,0*</b>
	CS	-	-	-	0,9	6,8	<b>-24,3*</b>	-3,7	<b>-41,5*</b>	<b>-34,1*</b>
GST	CA	-16,2	<b>-35,8*</b>	<b>-45,3*</b>	<b>-26,9*</b>	<b>-23,5*</b>	<b>-25,9*</b>	<b>38,9*</b>	<b>61,8*</b>	<b>54,0*</b>
	CS	-	-	-	<b>-24,3*</b>	<b>-20,8*</b>	<b>-23,3*</b>	<b>25,9*</b>	<b>46,6*</b>	<b>39,6*</b>
EST alfa	CA	-16,4	<b>-44,1*</b>	<b>-29,0*</b>	-6,7	<b>-15,8*</b>	<b>-21,9*</b>	12,7	-4,6	-14,6
	CS	-	-	-	-3,7	<b>-13,2*</b>	<b>-19,4*</b>	12,7	-4,6	-14,6
EST beta	CA	16,1	<b>-25,4*</b>	-0,8	<b>-17,8*</b>	<b>-15,5*</b>	<b>-16,4*</b>	-5,5	-10,5	<b>-17,5*</b>
	CS	-	-	-	<b>-15,4*</b>	<b>-13,0*</b>	<b>-13,9*</b>	-4,9	-9,9	<b>-17,0*</b>
CAT	CA	<b>-18,7*</b>	9,5	13,5	-21,7	-18,2	-19,7	-7,1	<b>48,3*</b>	<b>102,9*</b>
	CS	-	-	-	-9,4	-5,3	-7,0	-12,8	<b>39,2*</b>	<b>90,4*</b>
SOD	CA	8,0	<b>41,3*</b>	<b>22,3*</b>	-12,5	7,2	<b>37,6*</b>	<b>47,0*</b>	<b>102,8*</b>	<b>195,0*</b>
	CS	-	-	-	<b>-41,8*</b>	<b>-28,7*</b>	-8,5	26,3	<b>74,2*</b>	<b>153,5*</b>
LPO	CA	-0,3	-5,5	-3,7	-15,6	-17,4	-19,7	6,3	<b>53,4*</b>	<b>51,0*</b>
	CS	-	-	-	-12,5	-14,4	-16,7	6,7	<b>54,0*</b>	<b>51,6*</b>
Hb	CA	2,9	<b>-69,8*</b>	<b>-60,0*</b>	<b>-35,7*</b>	-8,7	<b>-53,1*</b>	-39,9	<b>-74,4*</b>	<b>-71,7*</b>
	CS	-	-	-	-20,5	12,9	<b>-42,1*</b>	-36,9	<b>-73,2*</b>	<b>-70,2*</b>

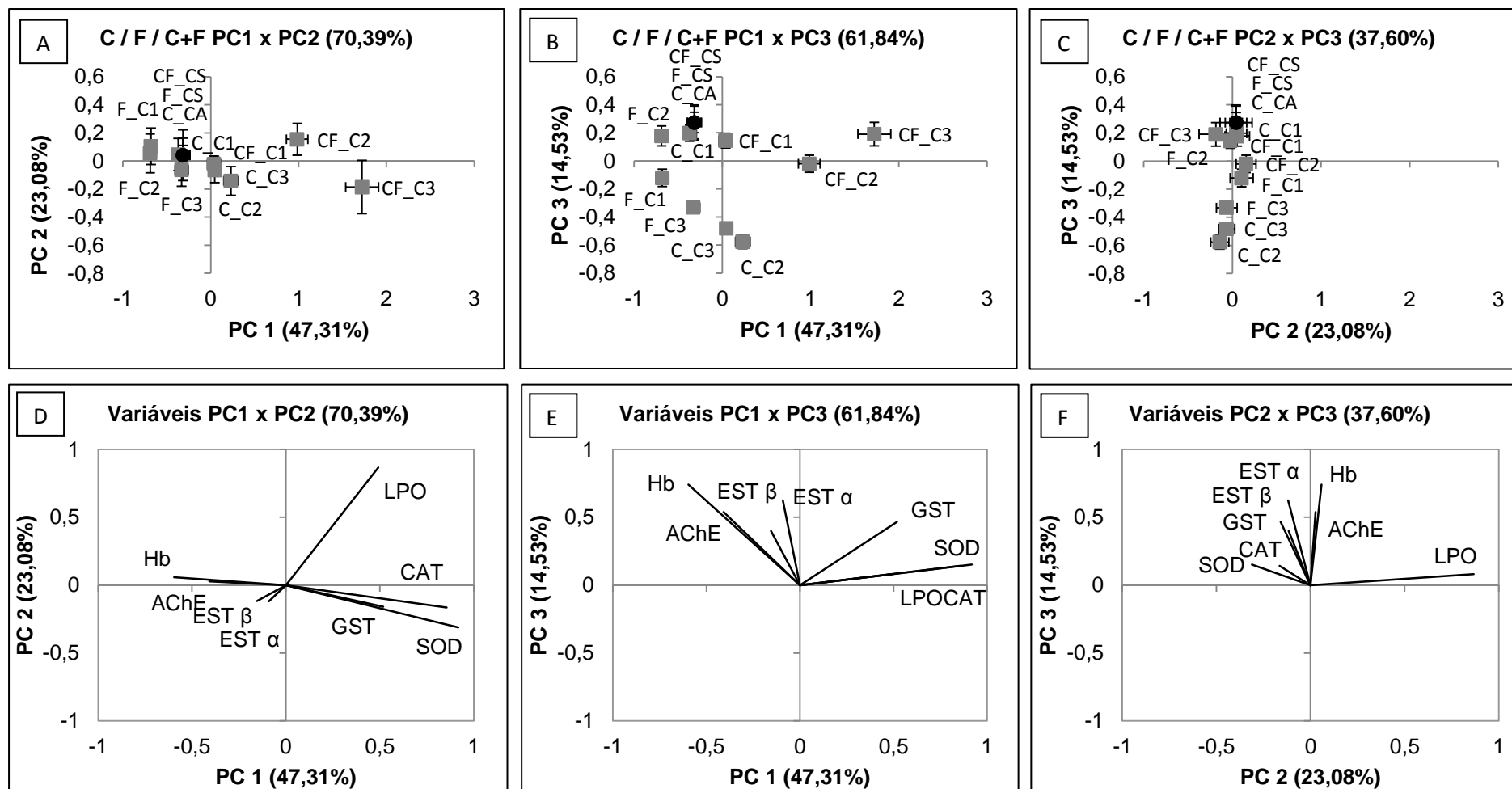


FIGURA 48: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao cádmio, fenantreno e mistura binária de cádmio e fenantreno. C\_CA = controle água; F\_CS / CF\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio; F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno; CF\_C1 = mistura C1 de C+F; CF\_C2 = mistura C2 de C+F; CF\_C3 = mistura C3 de C+F (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

### Comparação cádmio / malathion / fenantreno / cádmio+malathion+fenantreno

Quando comparados os efeitos bioquímicos das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao metal cádmio, ao inseticida malathion e ao hidrocarboneto fenantreno de formas isoladas com a exposição terciária desses três poluentes, foi possível observar maiores efeitos nos biomarcadores bioquímicos dos indivíduos expostos a mistura terciária dos xenobióticos.

Reduções mais expressivas foram observadas para as enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta e no conteúdo total de Hb nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos três poluentes. Já a enzima CAT apresentou aumento de atividade nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos três poluentes quando comparada as exposições individuais (Tabela 11).

A exposição individual de malathion evidenciou maiores efeitos na enzima SOD nas três concentrações testadas e na LPO na concentração C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup>) quando comparada as exposições cádmio, fenantreno e a mistura terciária (cádmio + malathion + fenantreno) (Tabela 11).

A análise de componentes principais (PCA), realizada com os biomarcadores bioquímicos após exposição ao cádmio, malathion, fenantreno isolados e mistura terciária dos poluentes, indicou que o componente principal 1 (PC1) explicou 41,38% da variação dos dados enquanto que os componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) explicaram 21,91 e 12,09% da variação, respectivamente, levando a uma variação cumulativa de 75,38% (Figura 49).

A representação gráfica dos escores do PC1, PC2 e PC3 indicam a formação de três agrupamentos, um formado pelos quatro controles e a maioria dos tratamentos, outro agrupamento formado pelas concentrações C2 e C3 de malathion e um último agrupamento composto pelas misturas C2 e C3 dos três compostos (Figura 49 A e B).

Todos os biomarcadores bioquímicos estão contribuindo para as variações encontradas na análise PC1 x PC2, sendo a LPO a mais expressiva e explicando mais o PC1 do que o PC2 (Figura 49D). Já o PC3 é explicado principalmente pelas atividades das enzimas SOD e GST (Figura 49 E e F).

Analisando as informações em conjunto foi possível identificar respostas dos biomarcadores bioquímicos na concentração C2 e C3 de malathion semelhantes às respostas da mistura terciária C2 e C3 e estes dois agrupamentos se diferenciaram do restante dos tratamentos, inclusive dos controles. As alterações enzimáticas descritas na tabela 11 corroboram os resultados encontrados pela análise de componentes principais, uma vez que a maioria dos biomarcadores sofreram mais alterações na mistura terciária e em seguida na exposição individual de malathion.

TABELA 12: Porcentagem de aumento/redução da atividade enzimática das enzimas AChE, GST, EST alfa, EST beta, CAT, SOD, LPO e conteúdo total de hemoglobina (Hb) em relação aos controles água e solvente em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion e fenantreno, e a mistura de cádmio, malathion e fenantreno. Números positivos representam aumento e números negativos representam redução da atividade enzimática comparada aos controles. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno

		Cádmio (%)			Malathion (%)			Fenantreno (%)			Cádmio + Malathion + Fenantreno (%)		
		0,001mg/L	3,2mg/L	7,4mg/L	0,0001mg/L	0,0564mg/L	0,1006mg/L	0,0025mg/L	1,25mg/L	2,44mg/L	C1	C2	C3
AChE	CA	-5,7	<b>-35,9*</b>	<b>-34,9*</b>	28,5	<b>-74,7*</b>	<b>-83,6*</b>	-6,2	-0,7	<b>-29,6*</b>	-5,0	<b>-71,0*</b>	<b>-97,1*</b>
	CS	-	-	-	23,6	<b>-75,6*</b>	<b>-84,2*</b>	0,9	6,8	<b>-24,3*</b>	-9,0	<b>-72,3*</b>	<b>-97,2*</b>
GST	CA	-16,2	<b>-35,8*</b>	<b>-45,3*</b>	-27,0	-10,6	-21,8	<b>-26,9*</b>	<b>-23,5*</b>	<b>-25,9*</b>	-28,3	<b>-64,6*</b>	<b>-68,7*</b>
	CS	-	-	-	-9,3	11,1	-2,9	<b>-24,3*</b>	<b>-20,8*</b>	<b>-23,3*</b>	-22,0	<b>-61,5*</b>	<b>-66,0*</b>
EST alfa	CA	-16,4	<b>-44,1*</b>	<b>-29,0*</b>	<b>40,0*</b>	<b>-57,4*</b>	<b>-71,4*</b>	-6,7	<b>-15,8*</b>	<b>-21,9*</b>	-18,0	<b>-69,4*</b>	<b>-82,3*</b>
	CS	-	-	-	28,1	<b>-61,0*</b>	<b>-73,8*</b>	-3,7	<b>-13,2*</b>	<b>-19,4*</b>	-27,6	<b>-73,0*</b>	<b>-84,3*</b>
EST beta	CA	16,1	<b>-25,4*</b>	-0,8	23,8	<b>-47,3*</b>	<b>-57,4*</b>	<b>-17,8*</b>	<b>-15,5*</b>	<b>-16,4*</b>	18,4	<b>-58,0*</b>	<b>-61,4*</b>
	CS	-	-	-	17,2	<b>-50,1*</b>	<b>-59,7*</b>	<b>-15,4*</b>	<b>-13,0*</b>	<b>-13,9*</b>	28,6	<b>-54,4*</b>	<b>-58,1*</b>
CAT	CA	<b>-18,7*</b>	9,5	13,5	<b>23,6*</b>	9,6	2,3	-21,7	-18,2	-19,7	7,9	<b>32,8*</b>	<b>23,6*</b>
	CS	-	-	-	6,7	-5,4	-11,6	-9,4	-5,3	-7,0	7,7	<b>32,6*</b>	<b>23,4*</b>
SOD	CA	8,0	<b>41,3*</b>	<b>22,3*</b>	<b>178,4*</b>	<b>64,2*</b>	<b>113,9*</b>	-12,5	7,2	<b>37,6*</b>	4,8	<b>20,3*</b>	-13,7
	CS	-	-	-	<b>68,1*</b>	-0,8	29,1	<b>-41,8*</b>	<b>-28,7*</b>	-8,5	-9,0	4,5	<b>-25,0*</b>
LPO	CA	-0,3	-5,5	-3,7	-16,2	48,0	<b>77,8*</b>	-15,6	-17,4	-19,7	26,7	<b>68,6*</b>	<b>59,8*</b>
	CS	-	-	-	-26,9	28,9	<b>54,9*</b>	-12,5	-14,4	-16,7	19,5	<b>59,1*</b>	<b>50,8*</b>
Hb	CA	2,9	<b>-69,8*</b>	<b>-60,0*</b>	24,6	-23,9	2,5	<b>-35,7*</b>	-8,7	<b>-53,1*</b>	-2,4	<b>-80,6*</b>	<b>-64,6*</b>
	CS	-	-	-	23,0	-24,9	1,1	-20,5	12,9	<b>-42,1*</b>	14,1	<b>-77,3*</b>	<b>-58,5*</b>

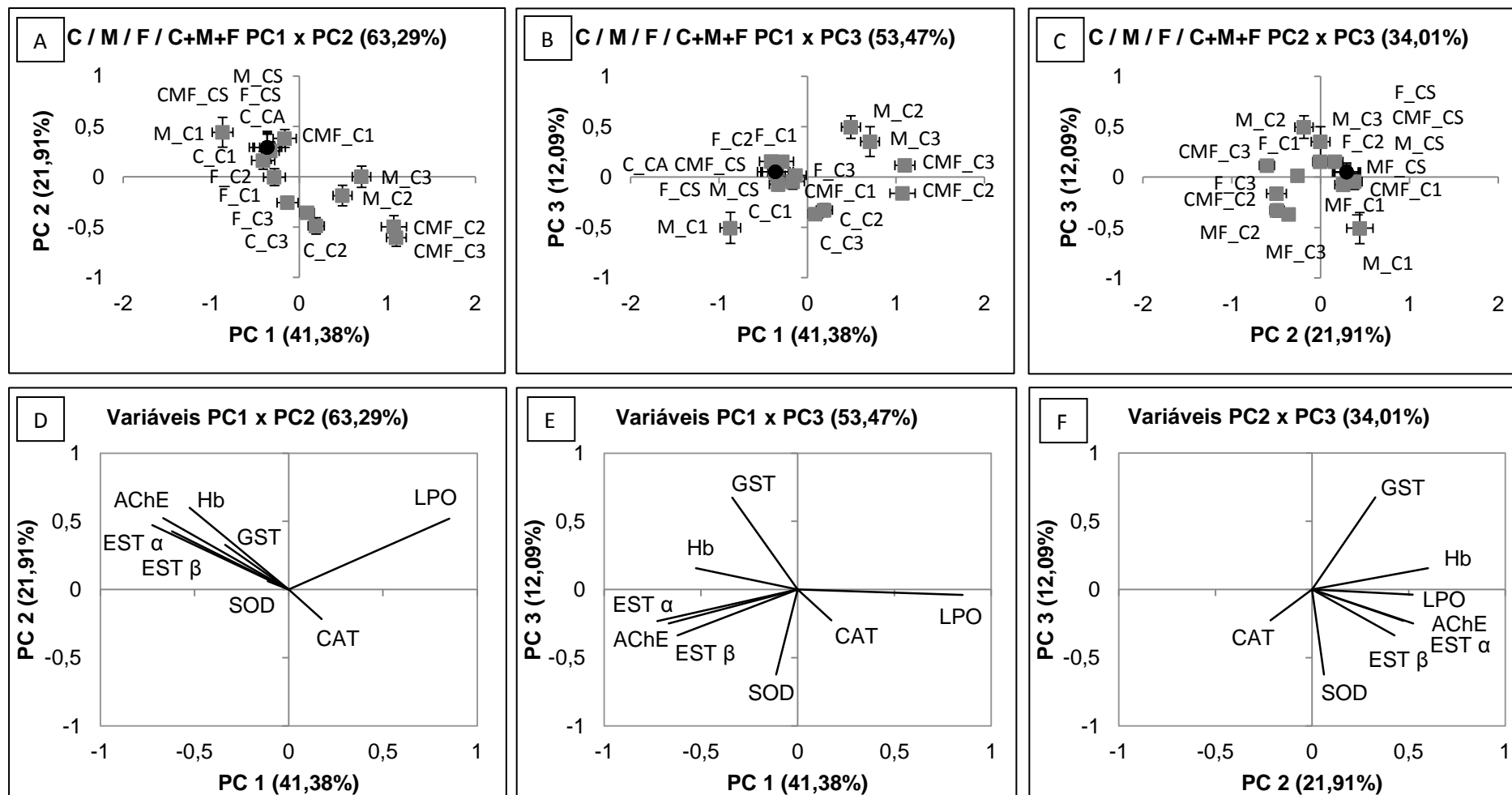


FIGURA 49: Análise dos componentes principais (PCA) e os respectivos biplot dos biomarcadores após exposição ao cádmio, malathion, fenantreno e mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno. C\_CA = controle água; M\_CS / F\_CS / CMF\_CS = controles solvente (símbolos redondo pretos); C\_C1 = concentração C1 de cádmio; C\_C2 = concentração C2 de cádmio; C\_C3 = concentração C3 de cádmio; M\_C1 = concentração C1 de malathion; M\_C2 = concentração C2 de malathion; M\_C3 = concentração C3 de malathion; F\_C1 = concentração C1 de fenantreno; F\_C2 = concentração C2 de fenantreno; F\_C3 = concentração C3 de fenantreno; CMF\_C1 = mistura C1 de C+M+F; CMF\_C2 = mistura C2 de C+M+F; CMF\_C3 = mistura C3 de C+M+F (símbolo quadrado cinza para todos tratamentos). Cada símbolo representa a média dos 20 escores  $\pm$  erro padrão de cada tratamento

## BIOMARCADORES MOLECULARES

## Malathion

As larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao inseticida malathion apresentaram alterações na expressão gênica das hemoglobinas. A hemoglobina B (HbB) apresentou redução significativa na concentração C1 (0,0001 mg L<sup>-1</sup>) de malathion comparada ao controle solvente (Figura 50A).

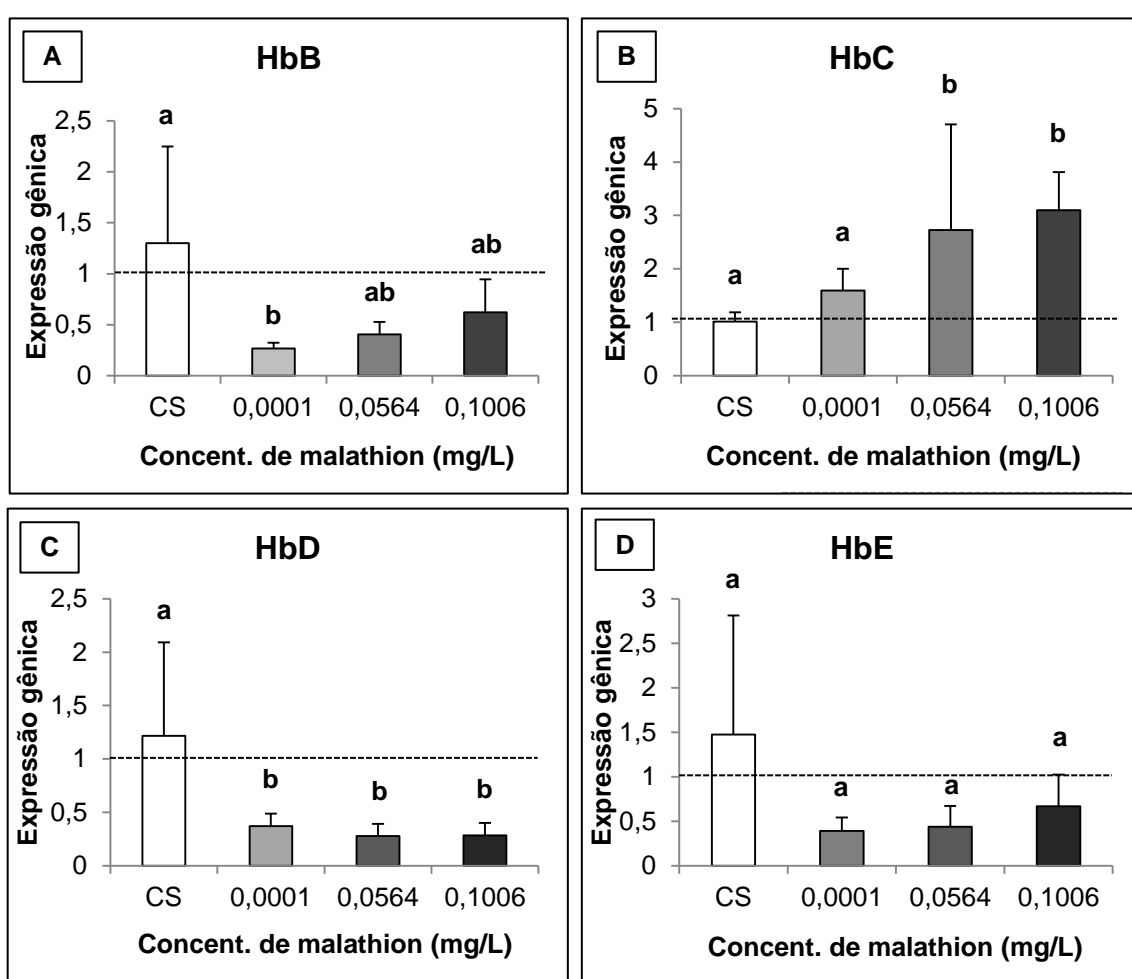


FIGURA 50: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao inseticida malathion por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

A hemoglobina C (HbC) apresentou aumento da expressão gênica nas concentrações C2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup>) e C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup>) de malathion quando comparada ao controle solvente (Figura 50B). Para a hemoglobina D (HbD) foi possível observar diminuição significativa nas três concentrações de malathion testadas quando comparadas ao controle solvente (Figura 50C). Já a hemoglobina E (HbE) não sofreu alterações significativas em relação ao controle solvente (Figura 50D).

### Fenantreno

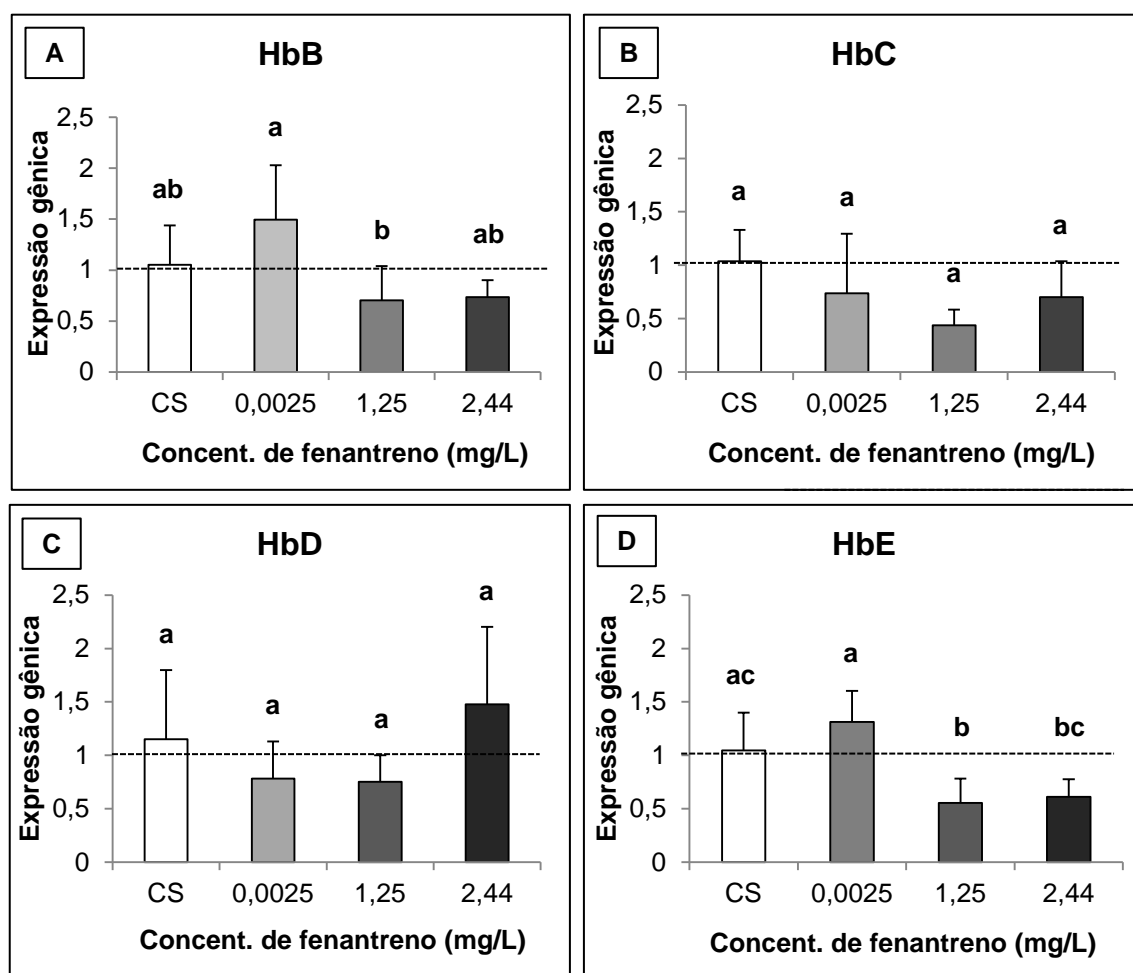


FIGURA 51: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticarioli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$



As larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno não apresentaram alterações significativas da expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC e HbD (Figura 51 A, B e C). Apenas a hemoglobina HbE teve a sua expressão reduzida na concentração C2 (1,25 mg L<sup>-1</sup>) de fenantreno quando comparada ao controle solvente (Figura 51D).

### Cádmio

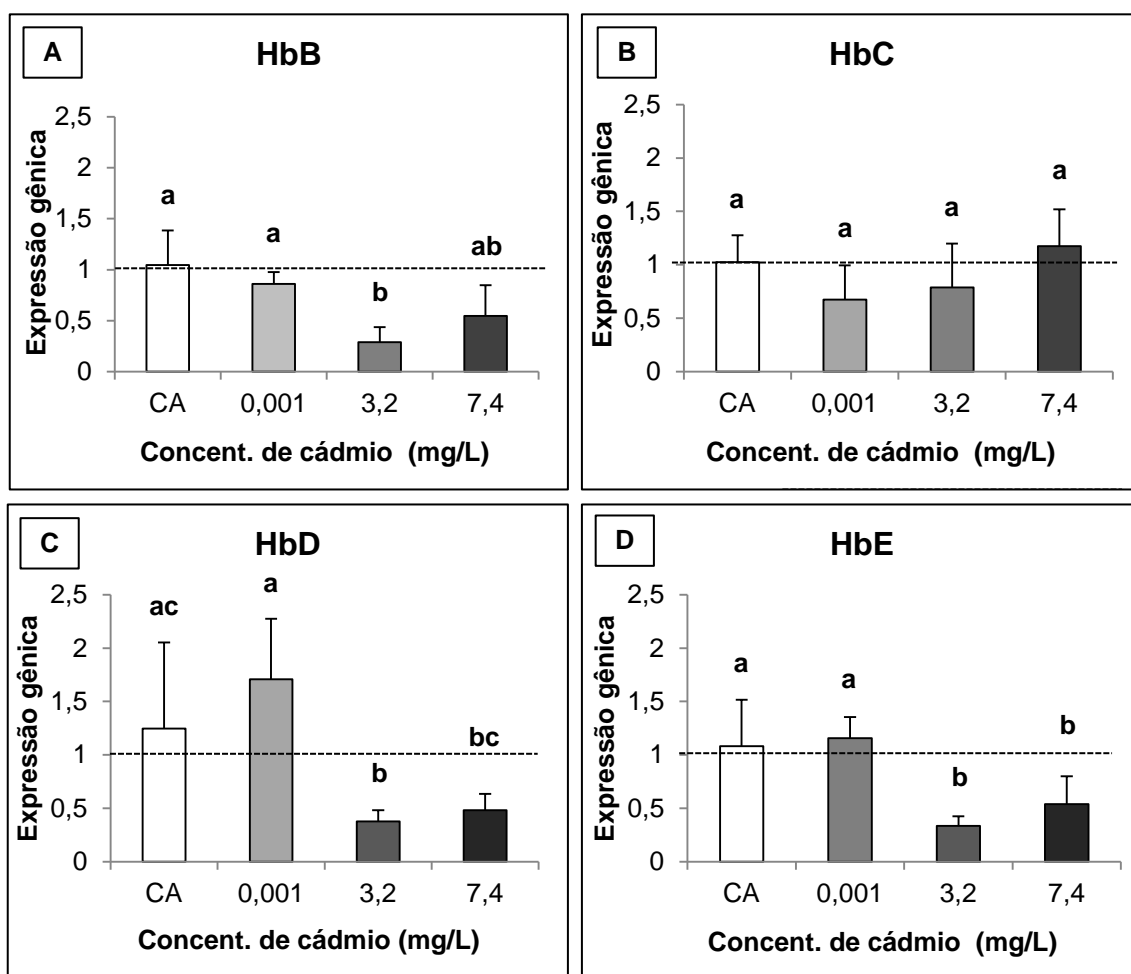


FIGURA 52: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao metal cádmio por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CA = controle água. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

As larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao metal cádmio apresentaram alterações na expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbD e HbE, portanto, apenas a HbC não apresentou alterações significativas em relação ao controle água (Figura 52B). Na expressão gênica de HbB foi possível observar redução significativa da hemoglobina na concentração C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup>) de cádmio quando comparada ao controle água (Figura 52A). Já para as HbD e HbE foram observadas reduções significativas das expressão gênicas nas concentrações C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup>) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup>) de cádmio em comparação com o controle água (Figura 52 C e D).

#### Mistura de malathion e fenantreno

A mistura de malathion e fenantreno indicou alterações na expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbD e HbE das larvas de *Chironomus sancticaroli*, portanto, apenas a HbC não apresentou alterações significativas de expressão em relação ao controle solvente (Figura 53B).

Foram observadas reduções significativas da expressão gênica da HbB nas larvas expostas a mistura C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de malathion e fenantreno (Figura 53A). Para a hemoglobina HbD foi possível observar reduções significativas de expressão nas misturas C1 (0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de malathion e fenantreno quando comparadas ao controle solvente (Figura 53C). Já os resultados da expressão gênica da hemoglobina HbE mostraram reduções significativas nas misturas C2 (0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de malathion e fenantreno em comparação com o controle solvente (Figura 53D).

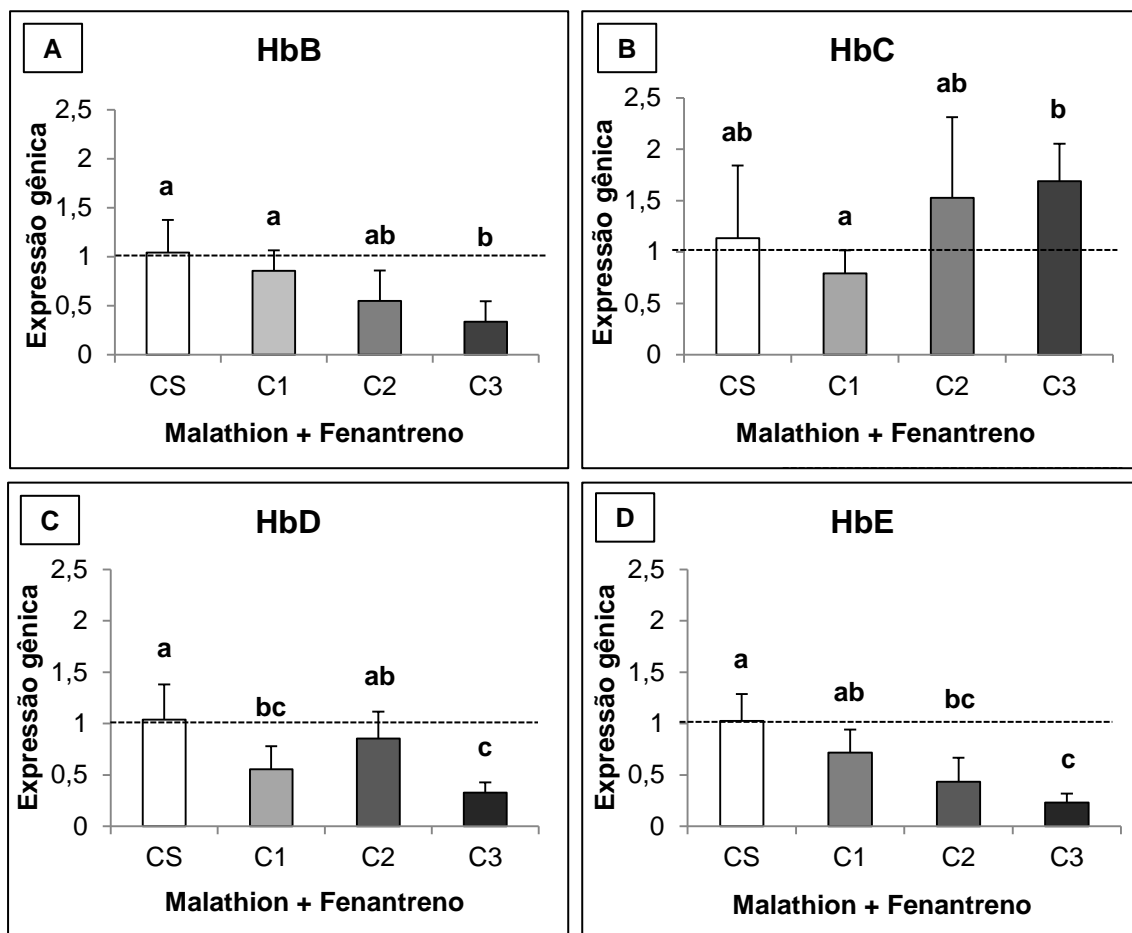


FIGURA 53: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticarloii* expostas à mistura binária de malathion e fenanthreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenanthreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenanthreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenanthreno. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

#### Mistura de cádmio e malathion

As larvas de *Chironomus sancticarloii* expostas a mistura binária de cádmio e malathion não apresentaram alterações significativas na expressão gênica das hemoglobinas HbC e HbD (Figura 54 B e C). Entretanto, as hemoglobinas HbB e HbE apresentaram reduções significativas das expressões gênicas nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion) de

cádmio e malathion quando comparadas ao controle solvente (Figura 54 A e D).

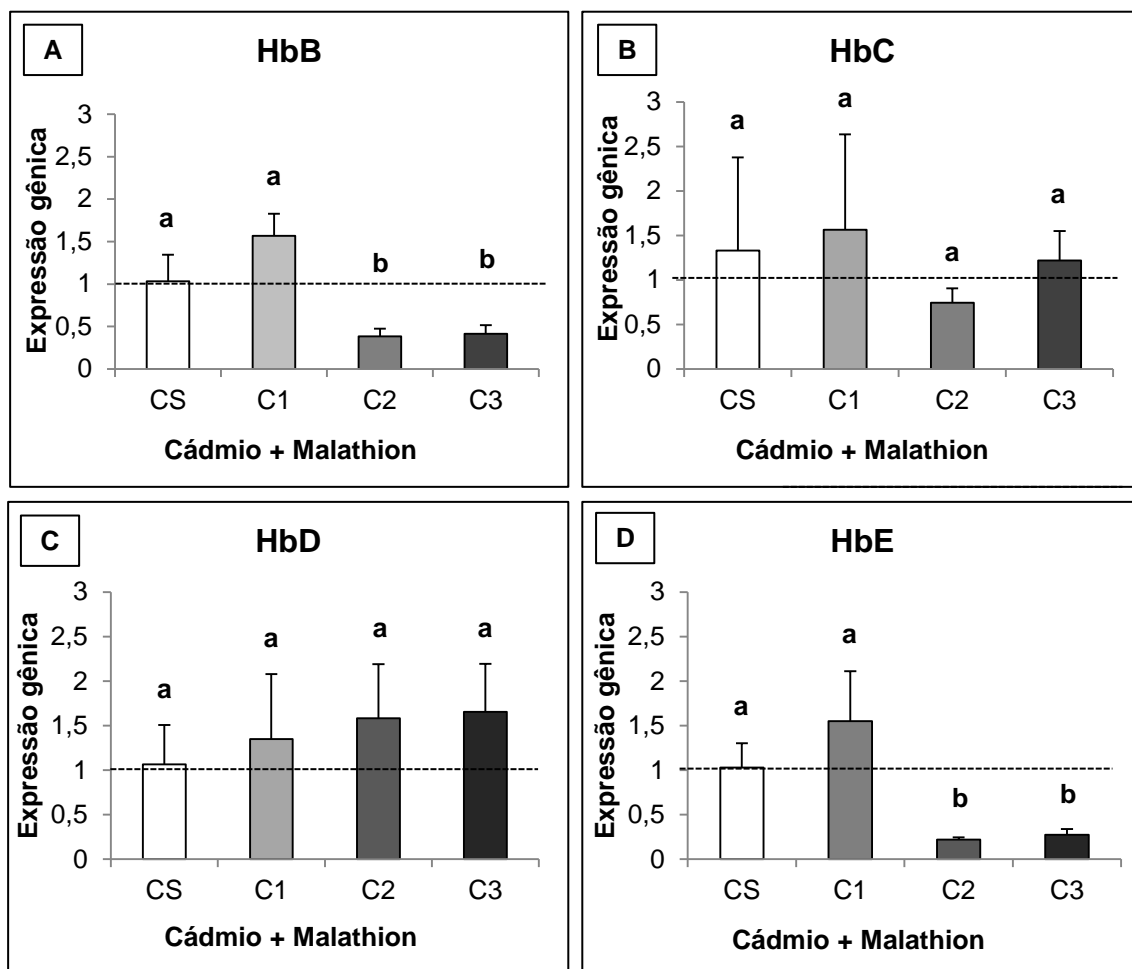


FIGURA 54: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticarioli* expostas à mistura binária de cádmio e malathion por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

#### Mistura de cádmio e fenantreno

As larvas de *Chironomus sancticarioli* expostas à mistura binária de cádmio e fenantreno não apresentaram alterações significativas na expressão gênica da hemoglobina HbD (Figura 55C). Entretanto, reduções significativas

na expressão gênica das hemoglobinas HbB e HbE foram observadas nas misturas C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) e C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de cádmio e fenantreno em comparação com o controle solvente (Figura 55 A e D). Já para a hemoglobina HbC foi observado redução significativa na expressão na mistura C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) dos poluentes quando comparado ao controle solvente (Figura 55B).

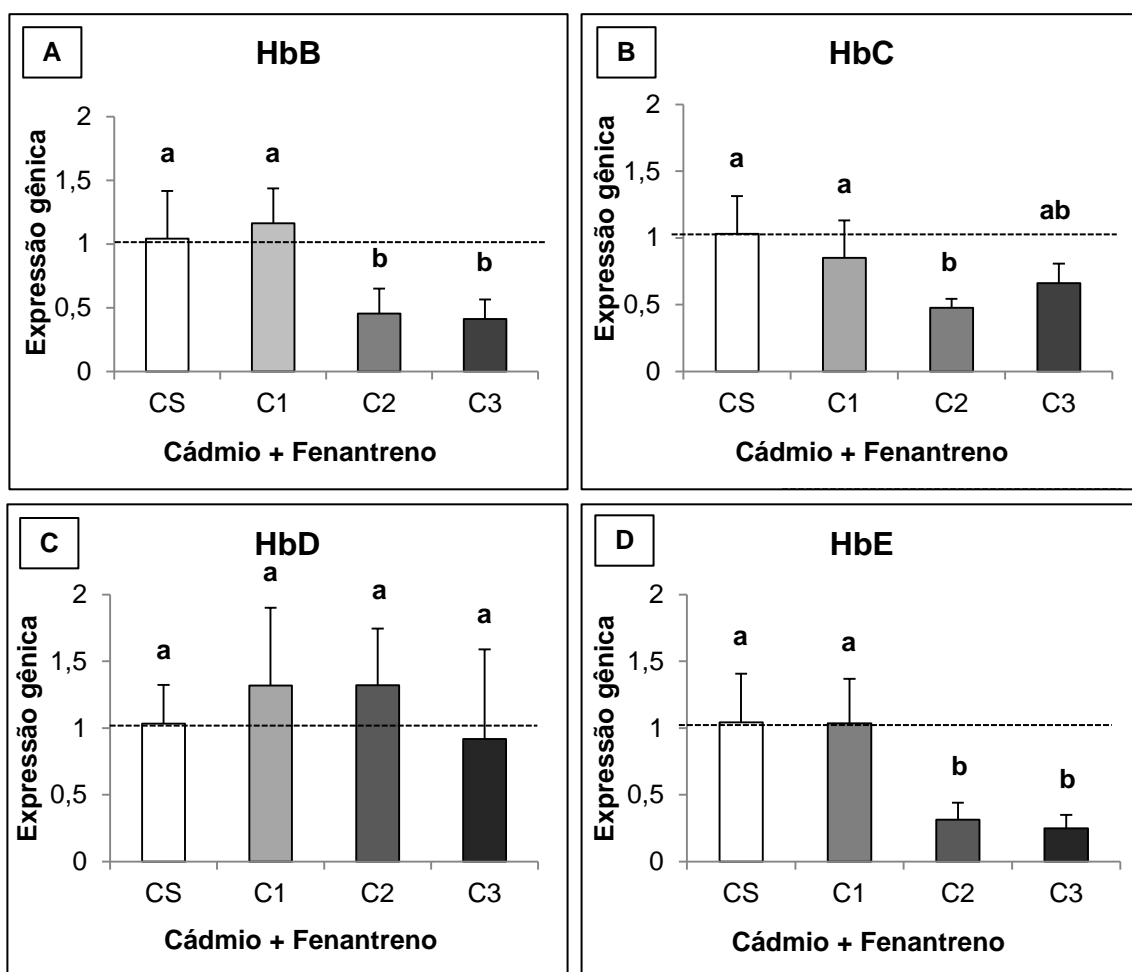


FIGURA 55: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticarioli* expostas à mistura binária de cádmio e fenantreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$

## Mistura de cádmio, malathion e fenantreno

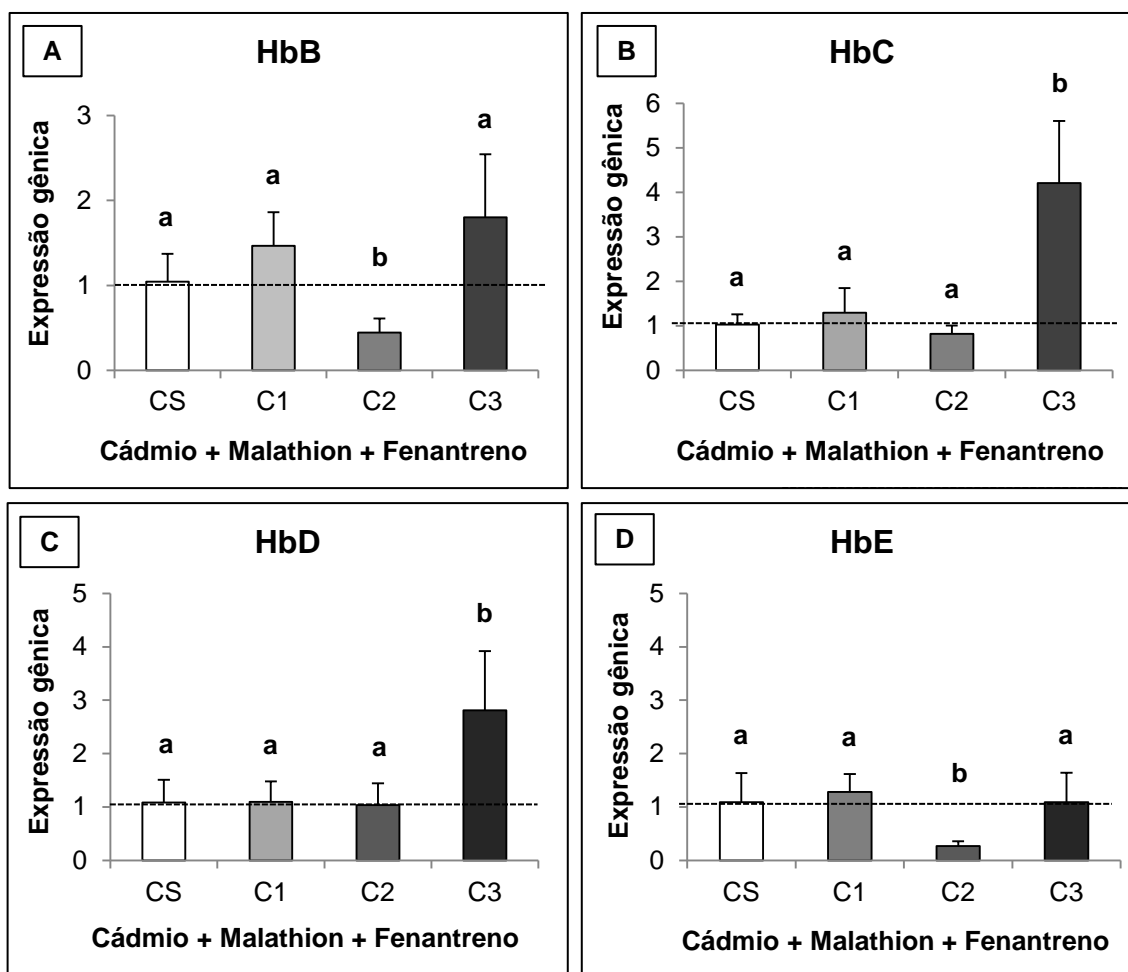


FIGURA 56: Expressão gênica em larvas de *Chironomus sancticarioli* expostas à mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno por 48h. A = hemoglobina B (HbB); B = hemoglobina C (HbC); C = hemoglobina D (HbD); D = hemoglobina E (HbE); CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno. A linha tracejada em 1 é utilizada como referência porque mudanças negativas na expressão gênica não podem ser calculadas com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizado na análise de qPCR. Portanto, valores acima de 1 indicam mais expressão gênica e valores abaixo de 1 indicam menos expressão gênica. Letras diferentes indicam diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

As larvas de *Chironomus sancticarioli* expostas à mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno apresentaram alterações na expressão gênica das quatro hemoglobinas avaliadas. Foi possível observar reduções significativas da expressão gênica das hemoglobinas HbB e HbE na mistura C2 (3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de

fenantreno) dos três compostos (Figura 56 A e D). Para as hemoglobinas HbC e HbD foram observados aumentos significativos da expressão gênica na mistura C3 (7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno) de cádmio, malathion e fenantreno quando comparadas ao controle solvente (Figura 56 B e C).

#### Comparação malathion / fenantreno / malathion + fenantreno

As larvas de *Chironomus sancticaroli* apresentaram menos efeito na expressão gênica das hemoglobinas quando expostas ao fenantreno em comparação as exposições individuais de malathion e mistura binária dos poluentes. Entretanto as alterações encontradas na exposição individual de malathion não foram as mesmas observadas para a mistura binária, indicando a interação entre o fenantreno e malathion quando misturados (Tabela 12).

#### Comparação cádmio / malathion / cádmio + malathion

As larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao malathion apresentaram alterações principalmente das hemoglobinas HbC e HbD. Já nas exposições de cádmio e mistura binária de cádmio e malathion as hemoglobinas afetadas foram as HbB e HbE, indicando que o cádmio provavelmente seja o composto que afete mais a expressão gênica das hemoglobinas na mistura binária (Tabela 13).

#### Comparação cádmio / fenantreno / cádmio + fenantreno

A exposição individual de fenantreno provocou menos efeito sobre a expressão gênica das hemoglobinas de *Chironomus sancticaroli* quando comparada as exposições individuais de cádmio e mistura binária dos poluentes. Já as alterações encontradas após exposição individual de cádmio e mistura binária de cádmio e fenantreno foram semelhantes, indicando pouca influência do composto fenantreno na mistura (Tabela 14).

#### Comparação cádmio / malathion / fenantreno / cádmio+malathion+fenantreno

A exposição individual de fenantreno foi a que provocou menos efeito sobre a expressão gênica das hemoglobinas de *Chironomus sancticaroli* quando comparada as outras exposições. O malathion alterou principalmente as hemoglobinas HbC e HbD e o cádmio as hemoglobinas HbB e HbE. A mistura terciária dos três poluentes afetou as quatro hemoglobinas, mas nas



HbB e HbE ocorreram reduções significativas e nas HbC e HbD aumentos significativos da expressão, indicando efeitos mais severos do que nas exposições individuais (Tabela 15).

TABELA 13: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbE em larvas de *Chironomus sancticarloi* expostas ao malathion, fenantreno e a mistura de malathion e fenantreno. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CS = controle solvente; C1 = 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno

	Malathion (mg L <sup>-1</sup> )				Fenantreno (mg L <sup>-1</sup> )				Malathion + Fenantreno			
	CS	0,0001	0,0564	0,1006	CS	0,0025	1,25	2,44	CS	C1	C2	C3
HbB	1,30	<b>0,27*</b>	0,40	0,62	1,05	1,50	0,70	0,73	1,04	0,86	0,55	<b>0,34*</b>
HbC	1,01	1,59	<b>2,73*</b>	<b>3,10*</b>	1,04	0,74	0,44	0,70	1,13	0,79	1,53	1,69
HbD	1,22	<b>0,37*</b>	<b>0,28*</b>	<b>0,29*</b>	1,15	0,78	0,75	1,48	1,04	<b>0,56*</b>	0,85	<b>0,33*</b>
HbE	1,47	0,39	0,44	0,67	1,05	1,31	<b>0,55*</b>	0,61	1,03	0,72	<b>0,44*</b>	<b>0,23*</b>

TABELA 14: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbE em larvas de *Chironomus sancticarloi* expostas ao cádmio, malathion, e a mistura de cádmio e malathion. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion

	Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )				Malathion (mg L <sup>-1</sup> )				Cádmio + Malathion			
	CA	0,001	3,2	7,4	CS	0,0001	0,0564	0,1006	CS	C1	C2	C3
HbB	1,04	0,86	<b>0,29*</b>	0,55	1,30	<b>0,27*</b>	0,40	0,62	1,03	1,57	<b>0,38*</b>	<b>0,41*</b>
HbC	1,02	0,68	0,79	1,18	1,01	1,59	<b>2,73*</b>	<b>3,10*</b>	1,33	1,57	0,75	1,22
HbD	1,25	1,71	<b>0,38*</b>	0,48	1,22	<b>0,37*</b>	<b>0,28*</b>	<b>0,29*</b>	1,06	1,35	1,58	1,66
HbE	1,08	1,16	<b>0,34*</b>	<b>0,54*</b>	1,47	0,39	0,44	0,67	1,03	1,55	<b>0,22*</b>	<b>0,27*</b>

TABELA 15: Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbD em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, fenantreno, e a mistura de cádmio e fenantreno. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno

	Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )				Fenantreno (mg L <sup>-1</sup> )				Cádmio + Fenantreno			
	CA	0,001	3,2	7,4	CS	0,0025	1,25	2,44	CS	C1	C2	C3
HbB	1,04	0,86	<b>0,29*</b>	0,55	1,05	1,50	0,70	0,73	1,04	1,16	<b>0,45*</b>	<b>0,41*</b>
HbC	1,02	0,68	0,79	1,18	1,04	0,74	0,44	0,70	1,03	0,85	<b>0,48*</b>	0,66
HbD	1,25	1,71	<b>0,38*</b>	0,48	1,15	0,78	0,75	1,48	1,03	1,32	1,32	0,92
HbE	1,08	1,16	<b>0,34*</b>	<b>0,54*</b>	1,05	1,31	<b>0,55*</b>	0,61	1,04	1,04	<b>0,31*</b>	<b>0,25*</b>

TABELA 16: : Expressão gênica das hemoglobinas HbB, HbC, HbD e HbD em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao cádmio, malathion, fenantreno, e a mistura de cádmio, malathion e fenantreno. Números acima de 1 representam aumento e números abaixo de 1 representam redução da expressão. Os asteriscos representam alteração significativa para  $p < 0,05$ . CA = controle água; CS = controle solvente; C1 = 0,001 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0001 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 0,0025 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C2 = 3,2 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,0564 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 1,25 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno; C3 = 7,4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio + 0,1006 mg L<sup>-1</sup> de malathion + 2,44 mg L<sup>-1</sup> de fenantreno

	Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )				Malathion (mg L <sup>-1</sup> )				Fenantreno (mg L <sup>-1</sup> )				Cádmio + Malathion + Fenantreno			
	CA	0,001	3,2	7,4	CS	0,0001	0,0564	0,101	CS	0,0025	1,25	2,44	CS	C1	C2	C3
HbB	1,04	0,86	<b>0,29*</b>	0,55	1,30	<b>0,27*</b>	0,40	0,62	1,05	1,50	0,70	0,73	1,04	1,47	<b>0,45*</b>	1,80
HbC	1,02	0,68	0,79	1,18	1,01	1,59	<b>2,73*</b>	<b>3,10*</b>	1,04	0,74	0,44	0,70	1,02	1,29	0,82	<b>4,21*</b>
HbD	1,25	1,71	<b>0,38*</b>	0,48	1,22	<b>0,37*</b>	<b>0,28*</b>	<b>0,29*</b>	1,15	0,78	0,75	1,48	1,08	1,10	1,04	<b>2,81*</b>
HbE	1,08	1,16	<b>0,34*</b>	<b>0,54*</b>	1,47	0,39	0,44	0,67	1,05	1,31	<b>0,55*</b>	0,61	1,09	1,28	<b>0,27*</b>	1,09

## DISCUSSÃO

O cenário atual de poluição dos ambientes aquáticos é complexo e muitas são as dificuldades enfrentadas para se avaliar os riscos que a biota aquática, a população humana e os ecossistemas aquáticos estão expostos. A demanda por estudos que priorizem as interações entre as diferentes classes de poluentes aumenta constantemente devido à necessidade de se caracterizar esses ambientes a partir da bioquímica envolvida nos processos de exposição à mistura de poluentes.

### Quantificação analítica dos poluentes

As quantificações nominais geralmente não representam fielmente o cenário de exposição dos testes de toxicidade, portanto, as quantificações reais são necessárias para que se possa entender a dinâmica dos poluentes ao longo dos experimentos e atribuir os efeitos observados às concentrações biodisponíveis testadas em laboratório.

As concentrações de malathion nos ambientes aquáticos tipicamente são inferiores a  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ , mas podem atingir  $0,030 \text{ mg L}^{-1}$  imediatamente após a aplicação do inseticida em áreas adjacentes ou nas estações menos chuvosas, como observado na Índia em reservatório de fornecimento de água (RAO; WANI, 2015).

As concentrações de fenantreno podem variar de  $0,02$  a  $0,24 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (DOONG; LIN, 2004), podendo chegar a  $1,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em ambientes impactados (ZHOU; MASKAOUI, 2003). Os valores encontrados de fenantreno para as águas superficiais muitas vezes não refletem o encontrado bioacumulado na biota aquática (SIDDIQI et al., 2009; FROEHNER et al., 2011). Isso pode ser explicado pela sua alta afinidade com a matéria orgânica dos sedimentos, por isso, o fenantreno geralmente é quantificado nesses componentes dos ecossistemas aquáticos e no Brasil já foram registrados casos onde os valores estavam acima do permitido pela legislação (Resolução CONAMA 454, 2012) (NISHIGIMA et al., 2001; WUNDERLICH et al., 2015).

Outro xenobiótico encontrado nos ecossistemas aquáticos em grande quantidade resultante da ação antrópica é o cádmio, o qual normalmente é encontrado nos corpos d'água em concentrações menores de  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  (ALVES et al., 2010), mas pode atingir  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  em áreas com distúrbios ambientais (World Bank Group, 1999) e já foram relatadas concentrações acima de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  em locais contaminados (Environmental Integrity Project and Earthjustice, 2010).

As quantificações dos poluentes no início dos experimentos foram semelhantes com as concentrações nominais e para os três poluentes avaliados as concentrações iniciais foram similares, para uma mesma concentração, tanto nas exposições de forma isolada quanto nas misturas, o que viabilizou as comparações de efeito entre os experimentos, gerando uma análise consistente para as três classes de poluentes testadas.

Ao longo das 48h de experimento o metal cádmio se mostrou estável, não apresentando reduções em suas quantificações. Resultados semelhantes já foram relatados em exposição ao cádmio com duração de sete dias (WU et al., 2012). Entretanto, ao longo dos experimentos com o inseticida malathion e HPA fenantreno ocorreram altas taxas de degradação.

No meio ambiente o malathion pode ser oxidado por diferentes agentes oxidantes, como a radiação ultravioleta, peróxidos de hidrogênio e óxidos de zinco (MENG et al., 2010). Apresenta uma meia-vida em água para transformações não relacionadas com a luz de 6,3 dias (RYBERG; GILLIOM, 2015), mas a sua sensibilidade a luz é uma propriedade já relatada (KRALJ et al., 2007; WU; LINDEN, 2010; FADAEI; KARGAR, 2015), portanto, a fotodegradação pode ser um dos principais fatores na redução da quantificação de malathion nos experimentos.

GUST; FLEEGER (2005), relatam a degradação de 50% de fenantreno nas exposições realizadas com o anfípoda *Hyaella azteca* (Saussure, 1858) (Crustacea: Amphipoda). A biodegradação, a transformação química e reações de fotólises são alguns processos que podem justificar a degradação do fenantreno nos experimentos (JIA et al., 2015). Embora seja um composto hidrofílico, a solubilidade em água é um fator que pode influenciar as taxas de degradação do composto, por exemplo, o fenantreno degrada mais rápido que

o HPA antraceno, que também possui três anéis aromáticos, entretanto por ser mais solúvel em água do que o antraceno a sua degradação é mais rápida (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2011). Após comparação entre ambientes aquáticos de água doce e salinos, BRUYN et al. (2012), verificaram que o principal fator responsável pela degradação do fenantreno é a luminosidade.

É importante ressaltar que todos os efeitos encontrados no presente trabalho estão relacionados diretamente com as concentrações mensuradas ao longo dos experimentos, portanto, isso deve ser levado em consideração em todas as análises e discussões realizadas a partir das alterações observadas para cada poluente e suas misturas.

### Comparação Malathion e Fenantreno

Os inseticidas organofosforados (OF), como o malathion, e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), como o fenantreno, são compostos frequentemente inseridos nas atividades humanas e, por esse motivo, são encontrados contaminando simultaneamente o meio ambiente em diversas regiões do mundo (CLAYTON et al., 2003; WANG et al., 2012). Entender as interações dessas duas classes de poluentes e os efeitos gerados na biota aquática é extremamente importante para a avaliação do risco ecológico.

Levando-se em consideração a faixa de mortalidade para cada composto foi possível observar que o inseticida OF malathion é mais tóxico para *Chironomus sancticaroli* que o HPA fenantreno, os quais apresentaram os valores de  $CL_{50}$  48h de 0,1006 e 2,44 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A exposição individual ao malathion resultou em porcentagens elevadas de larvas com alterações de comportamento em todas as concentrações testadas, quando comparadas a exposição individual de fenantreno. Essas alterações de comportamento são caracterizadas por espasmos e dificuldade de movimentação, o que reduz a capacidade das larvas em se enterrarem e produzirem os tubos de seda e sedimento responsáveis pela proteção dos indivíduos. A ausência de abrigo determina a exposição das larvas na superfície do sedimento, podendo resultar em

distúrbios na relação presa-predador nos ecossistemas aquáticos (LANGER-JAESRICH et al., 2010b).

Alterações de comportamento já foram relatadas em Chironomidae expostos a inseticidas (LANGER-JAESRICH et al., 2010a; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011a; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011b), indicando comprometimento da alimentação e consequentemente maior susceptibilidade a doenças, mesmo quando a exposição ao inseticida não afeta a resposta imune do inseto (JAMES; XU, 2012).

A enzima AChE é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético nas fendas sinápticas, portanto, regula a transmissão do impulso nervoso (LIONETTO et al., 2013). A exposição ao malathion mostrou reduções na atividade da enzima AChE nas duas maiores concentrações testadas. O efeito de inibição da enzima AChE por inseticidas OF é conhecido em diversas espécies de insetos e em Chironomidae já foram relatados efeitos de neurotoxicidade via inibição da AChE (MEHLER et al., 2008; VAN PRAET et al., 2014; REBECHI et al., 2014).

Embora alterações na atividade da AChE seja o modo de ação principalmente dos inseticidas OF e carbamatos, outros compostos tóxicos vem mostrando potenciais efeitos na atividade da enzima, como é o caso dos HPAs (LIONETTO et al., 2003; GRINTZALIS et al., 2012; NAM et al., 2015). No presente estudo, o fenantreno reduziu a atividade da enzima na maior concentração avaliada. Este efeito neurotóxico provavelmente foi ocasionado indiretamente pelo fenantreno, o qual pode através do estresse oxidativo interferir nas vias de produção da enzima (GRINTZALIS et al., 2012).

A mistura binária de malathion e fenantreno apresentou as maiores inibições na atividade da AChE nos tratamentos, indicando um efeito de sinergismo na mistura. A interação entre inseticidas OF e os HPAs já foram descritos na literatura resultando em reduções na atividade da AChE de forma aditiva (JETT et al., 1999).

As enzimas EST alfa e EST beta apresentam uma importante função relacionada ao sequestro e metabolismo de compostos xenobióticos, especialmente inseticidas OF (NIGAM et al., 2014). O malathion reduziu a atividade das duas enzimas nas maiores concentrações testadas, indicando

uma resposta metabólica importante frente à exposição, pois cada molécula de enzima é capaz de sequestrar uma molécula de inseticida OF, reduzindo a quantidade de inseticida disponível para interagir com as AChEs (SOGORB; VILANOVA, 2002), portanto, é possível afirmar que os efeitos encontrados para AChE poderiam ser ainda mais graves na exposição ao malathion.

Os efeitos encontrados nas enzimas EST alfa e EST beta na exposição ao fenantreno, embora menores que na exposição ao malathion, indicam que estas enzimas também atuam no metabolismo de compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. LETICIA; GERARDO (2008), também encontraram reduções nas esterases após exposição de 24h do peixe *Haemulon plumieri* Lacépède, 1801 ao HPA benzo[a]pireno.

As esterases (alfa e beta) apresentaram reduções semelhantes nas atividades após exposição ao malathion individualmente e após a mistura binária de malathion e fenantreno, indicando menor influência do fenantreno para as respostas dessas enzimas.

A família de enzimas GSTs é um importante componente do sistema de desintoxicação celular, protegendo as células dos metabólitos reativos derivados dos xenobióticos (HAYES et al., 2005). No presente trabalho foram observadas reduções na atividade da GST na exposição ao fenantreno. Resultados similares foram encontrados por LÜCHMANN et al. (2014), os quais observaram reduções de GST em espécie de ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia) exposta ao fenantreno por 24h.

A enzima antioxidante SOD apresentou diferenças entre os controles água e solvente nas exposições individuais de malathion e fenantreno, indicando um possível efeito tóxico do solvente etanol. Entretanto, essas diferenças não foram observadas na exposição binária dos poluentes, dificultando a compreensão de um possível efeito tóxico do etanol. Embora o presente trabalho tenha utilizado concentrações muito baixas do solvente etanol, não se pode descartar completamente o efeito do solvente, pois já foram relatados efeitos do etanol no sistema antioxidante, induzindo a produção de ERO (HSIEH et al., 2015).

Mesmo que o solvente etanol esteja alterando a atividade da enzima SOD não se pode descartar o efeito gerado pelo malathion em baixa



concentração. O malathion na concentração mais baixa testada apresentou um aumento de atividade de SOD maior que a encontrada para o controle solvente. O aumento da SOD indica que o sistema antioxidante está conseguindo combater as espécies reativas de oxigênio (ERO) provenientes do metabolismo do malathion, como também observado em espécie de gafanhoto *Oxya chinensis* (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae) expostos por 24h ao inseticida malathion (WU, et al., 2011a).

Nas concentrações mais elevadas de malathion as enzimas SOD e CAT não foram alteradas, entretanto, o conteúdo de hidroperóxidos foi significativamente elevado na maior concentração de malathion, indicado o dano de peroxidação lipídica nos organismos. Resultado semelhante foi descrito por KAMALADEVI et al. (2013), que observaram aumento da produção de ERO, hidroperóxidos e proteínas carboniladas em *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) (Nematoda: Secernentea) expostos ao inseticida malathion.

Na exposição ao fenantreno a atividade da enzima SOD foi reduzida nas duas primeiras concentrações. Reduções na atividade da SOD já foram relatadas para *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Clitellata) exposta ao fenantreno por 28 dias (WU, S. et al., 2011b). Estas reduções indicam que as ERO podem estar se acumulando no organismo, mas como nenhum dano de peroxidação lipídica foi observado não foi gerado um quadro de estresse oxidativo. Além disso, nessa mesma exposição não foram observadas alterações na enzima CAT, o que confirma a ausência de estresse oxidativo provocado por peróxidos de hidrogênio.

Na mistura binária de malathion e fenantreno foi observado aumento da atividade da enzima CAT na maior concentração testada e não foram observadas alterações da atividade enzimática da SOD e danos de peroxidação lipídica, o que indica que o sistema antioxidante foi eficiente no combate as ERO.

Com relação ao conteúdo total de hemoglobina foi possível observar reduções na maior concentração de fenantreno testada e nas duas misturas mais altas de malathion e fenantreno, indicando que provavelmente o fenantreno é o composto com contribuição mais elevada para este efeito. Redução do conteúdo total de hemoglobina foi relatada em espécie de peixe

*Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel, 1846) (Actinopterygii: Pleuronectiformes) exposta ao fenantreno por quatro semanas (JEE; KANG, 2004). Entretanto nenhum registro foi encontrado em relação a invertebrados e a interação malathion x fenantreno interferindo em parâmetros de hemoglobina.

No nível transcricional, após exposição ao malathion, foram observadas reduções das hemoglobinas HbB e HbD e aumento da HbC, no entanto o conteúdo total de hemoglobina mensurado permaneceu inalterado. Reduções de expressão gênica das HbB e HbD já foram relatados em *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) (Diptera: Chironomidae) expostos por 24h ao inseticida OF clorpirifós e ao herbicida paraquat (LEE et al., 2006; HA; CHOI, 2008b).

Na exposição ao fenantreno foram observadas reduções de expressão gênica apenas da HbE. Já HA; CHOI, (2008), observaram aumento da expressão da HbE após 24h de exposição de *Chironomus riparius* ao HPA benzo[a]pireno. Provavelmente a diferença entre os resultados esteja relacionada ao fato do benzo[a]pireno possuir cinco anéis aromáticos e por essa razão ser considerado mais tóxico que o fenantreno (MEIRE et al., 2007). Embora o fenantreno tenha reduzido apenas a expressão de HbE foi possível observar uma redução no conteúdo total de hemoglobinas nos indivíduos expostos ao fenantreno.

Na mistura binária de malathion e fenantreno foi observado maiores reduções das hemoglobinas em relação às exposições individuais e elas ocorreram para as HbB, HbD e HbE. Pouco se conhece dos efeitos de misturas de inseticidas OF e HPAs sobre as hemoglobinas, entretanto, fica evidente o quanto essa mistura afeta esses componentes biológicos. Em Chironomidae as hemoglobinas apresentam heterogeneidade funcional e, diferentemente do que é encontrado para os vertebrados, não são responsáveis apenas pelo transporte e estocagem de oxigênio e dióxido de carbono, mas apresentam também a função de peroxidases, auxiliando o organismo a combater as ERO (SHOBANOV, 2004). Portanto, as reduções no nível transcricional e no conteúdo total de hemoglobinas encontradas no presente trabalho indicam que os organismos estavam mais suscetíveis à condição de estresse oxidativo na exposição ao malathion e fenantreno.

Analisando em conjunto todos os biomarcadores enzimáticos e moleculares é possível indicar que a mistura binária de malathion e fenantreno alterou mais os biomarcadores do que as exposições individuais e de acordo com as análises de PCA, o malathion foi o composto que contribuiu mais para esses efeitos. Os modelos de CA e IA corroboram esses resultados, pois subestimaram os reais efeitos da mistura. OLMSTEAD; LEBLANC (2005), descrevem que a toxicidade de misturas muitas vezes pode ser prevista pela toxicidade do principal contribuinte da toxicidade individual. No presente estudo, com relação à mortalidade, o malathion foi 24,4 vezes mais letal que o fenantreno e provavelmente esta diferença é que gerou o aumento da toxicidade da mistura.

#### Comparação Malathion e Cádmio

É frequentemente descrito na literatura a ocorrência simultânea do inseticida malathion e do metal cádmio em águas superficiais, sedimentos e na biota de ambientes aquáticos (MANSOUR; SIDKY, 2003; CHARALAMPOUS et al., 2015; TRAORE et al., 2015). Entender as possíveis interações que estes dois contaminantes podem ter em conjunto é necessário para compreensão dos potenciais riscos que a biota aquática está exposta. O organismo modelo deste estudo, *Chironomus sancticaroli*, se mostrou mais sensível ao inseticida malathion do que ao metal cádmio, quando são levados em consideração os valores de CL<sub>50</sub> 48h calculados de 0,1006 e 7,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Assimetrias nas respostas de organismos aquáticos podem ser detectadas a um mesmo composto, como é o caso da planária *Dugesia japonica* Ichikawa & Kawakatsu, 1964 (Platyhelminthes: Tricladida), a qual apresentou um valor de CL<sub>50</sub> 48h de 1,25 mg L<sup>-1</sup> de cádmio (WU et al., 2012), portanto, quase 6 vezes mais sensível que *Chironomus sancticaroli*. A espécie de crustáceo *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (Crustacea: Branchiopoda), se mostrou 290 vezes mais tolerante ao inseticida malathion em relação a *Chironomus sancticaroli*, com CL<sub>50</sub> 48h de 29 mg L<sup>-1</sup> (JARAMILLO et al., 2013).

Após a exposição de *Chironomus sancticaroli* ao malathion foi possível observar número mais elevado de larvas com alteração de comportamento do que mortas, enquanto que para o cádmio foi observada uma porcentagem similar entre larvas mortas e com alteração de comportamento. Esses resultados indicam alta toxicidade do cádmio já que estão sendo comparadas as mesmas unidades tóxicas (0,5 e 1UT) para ambos poluentes. Entretanto, na exposição individual ao malathion foram observadas inibições acima de 70% da enzima AChE, o que significa uma inibição 2,3 vezes maior em relação a exposição de cádmio. Inibições maiores de 50% indicam ameaça a vida dos organismos (DAY; SCOTT, 1990). Embora não se possa afirmar que os indivíduos não irão sobreviver, essas altas taxas de inibições no sistema nervoso das larvas de *Chironomus sancticaroli* devem ser destacadas, indicando elevada toxicidade do malathion.

Tradicionalmente os inseticidas organofosforados e carbamatos são reconhecidos como compostos inibidores da enzima AChE, entretanto, alterações na atividade da enzima vem sendo relatadas após exposição a metais e outros compostos orgânicos (DURAN et al., 2012). No presente estudo, a exposição individual ao cádmio resultou em inibições de 30% da atividade da enzima. Dados semelhantes já foram relatados para *Chironomus riparius* expostos a sedimentos contaminados com diversos metais, inclusive o cádmio (MICHAILOVA et al., 2012). Metais pesados podem influenciar a atividade da enzima AChE através da alteração das reações de síntese ou simplesmente afetando a saúde geral dos organismos, o que leva a uma redução na produção da enzima (RICCIARDI et al., 2010).

A mistura binária de malathion e cádmio apresentou inibições da atividade da enzima AChE acima de 80%, portanto, efeitos mais acentuados em relação as exposições individuais. Embora sejam dois compostos anticolinesterásicos o efeito sinérgico não era necessariamente esperado, segundo o observado por PATHIRATNE; GEORGE (1998), o cádmio não influenciou a toxicidade do inseticida malathion sobre a enzima AChE após pré-tratamento de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Actinopterygii: Perciformes) com cádmio.

A exposição de cádmio reduziu as atividades das enzimas de desintoxicação EST alfa e EST beta. Esta redução foi ainda mais evidente na exposição individual ao malathion e na mistura binária de cádmio e malathion os valores de redução foram acima do encontrado para as exposições individuais. Resultado semelhante foi encontrado por AUGUSTYNIAK et al. (2005), que observaram reduções das esterases no gafanhoto *Chorthippus brunneus* (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae) exposto a um gradiente de metais (incluindo cádmio) e ao inseticida OF dimetoato. A partir dessas informações é possível afirmar que o inseticida malathion apresenta maior influência na atividade das esterases do que o metal cádmio e possivelmente o efeito encontrado na mistura seja um reflexo dessa maior interação das esterases com o malathion.

As GSTs desempenham um papel importante na desintoxicação do cádmio através de sua conjugação direta ou através de sua função antioxidante, eliminando os radicais livres provenientes das reações geradas pelo cádmio (ZHANG et al., 2014). No presente trabalho, foram observadas reduções da atividade da GST após exposição ao cádmio. Já a exposição ao malathion individualmente não apresentou efeitos significativos na atividade da GST, mas na mistura binária de malathion e cádmio foram observadas reduções mais expressivas do que na exposição ao cádmio, indicando que embora o malathion isolado não tenha gerado efeitos na GST, a combinação do inseticida com o metal ampliou os efeitos nessa enzima. Provavelmente a mistura está gerando um quadro de estresse oxidativo e possivelmente sejam esses metabólitos reativos os causadores dessas maiores alterações. O cádmio apresenta alta afinidade por tiól, portanto, o principal antioxidante que possui tiol em sua composição, a glutathiona (GSH), é o alvo primário para os íons  $\text{Cd}^{2+}$  livres, dessa forma, o cádmio induz uma redução na quantidade de GSH, resultando em um distúrbio do balanço redox e levando ao estresse oxidativo (LÓPEZ et al., 2006).

As atividades enzimáticas da CAT e SOD foram significativamente aumentadas, indicando a resposta do sistema antioxidante frente as espécies reativas de oxigênio geradas pela exposição binária de cádmio e malathion, entretanto, esse sistema não foi suficiente para impedir os danos de

peroxidação lipídica observados, confirmando o quadro de estresse oxidativo gerado pelos compostos. Danos de peroxidação lipídica gerados pelo estresse oxidativo já foram relatados em *Prosilocerus akamusi* Tokunaga, 1938 (Diptera: Chironomidae) expostos somente ao cádmio por 72h (ZHENG et al., 2011). Entretanto, este é o primeiro estudo com Chironomidae relacionando os efeitos da mistura binária de malathion e cádmio no sistema antioxidante.

No geral, para as exposições ao cádmio, ao malathion e para a mistura binária dos poluentes foram observadas reduções na expressão gênica das hemoglobinas, o que refletiu na redução do conteúdo total de hemoglobina na exposição binária e principalmente na exposição individual de cádmio. Estes resultados indicam que o metal cádmio apresenta maior influência sobre as hemoglobinas em Chironomidae. Provavelmente essa maior influência esteja relacionada ao estresse oxidativo mais intenso gerado pelo cádmio em comparação com o malathion.

A mistura binária de malathion e cádmio resultou em porcentagens de larvas com alteração de comportamento e mortalidades acima do observado para as exposições individuais, indicando um desvio na abordagem de adição prevista pelos modelos CA e IA. Portanto, a partir desses resultados e das respostas bioquímicas e moleculares é possível afirmar que existe uma interação entre esses xenobióticos, pois embora os componentes de uma mistura tenham mecanismos primários de toxicidade diferentes, eles ainda podem ter alguns efeitos secundários em comum (FORGET et al., 1999), potencializando os efeitos em mistura.

### Comparação Cádmio e Fenantreno

O metal cádmio não pode ser degradado no ambiente, portanto os riscos de exposições ambientais aumentam constantemente por causa da sua acumulação via cadeia trófica, intensificando a preocupação gerada pela sua contaminação (ATSDR, 2012). Já o HPA fenantreno é passível de ser degradado, entretanto, por suas propriedades lipossolúveis também pode se acumular nos organismos e ser biomagnificado ao longo da cadeia alimentar (ATSDR, 1995). O registro da ocorrência simultânea desses compostos nos

ambientes aquáticos (MIELKE et al., 2001; MUNIZ et al., 2004; DONAHUE et al., 2006; SPROVIERI et al., 2007) gera preocupação em consequência do potencial de biomagnificação de ambos poluentes, portanto, é de grande interesse a compreensão das interações geradas pelas exposições simultâneas a estes estressores ambientais (GAUTHIER et al., 2014).

Em relação à mortalidade o HPA fenantreno se mostrou mais tóxico que o metal cádmio para a espécie *Chironomus sancticaroli*, apresentando valores de CL<sub>50</sub> 48h de 2,44 e 7,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Essa relação de toxicidade não se manteve nos biomarcadores bioquímicos e moleculares, indicando maior sensibilidade de resposta desses biomarcadores em relação ao *endpoint* mortalidade.

O modelo que melhor explicou a toxicidade da mistura na segunda concentração foi o IA, já para a mistura mais concentrada dos dois poluentes ambos os modelos, CA e IA, subestimaram a toxicidade, sendo esta considerada sinergismo. Estes resultados indicam que na mistura equitóxica de 0,5 unidades tóxicas (UT) de cada poluente ocorreu uma adição das respostas de cada composto e como os mecanismos de ação são diferentes, os compostos acabam não interagindo diretamente. Entretanto, na mistura equitóxica de 1 UT de cada poluente, provavelmente os diferentes mecanismos de ação de cada composto acabam gerando efeitos secundários de estresse oxidativo, que são somados e acabam gerando um efeito sinérgico da mistura. A interação entre metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos frequentemente gera interações sinérgicas (revisão em GAUTHIER et al., 2014).

Esse efeito de sinergismo encontrado na mistura pode ser confirmado pelos danos de peroxidação lipídica observados em *Chironomus sancticaroli* expostos simultaneamente ao cádmio e fenantreno. Embora as atividades das enzimas SOD e CAT tenham aumentado, indicando o combate as espécies reativas de oxigênio, o sistema antioxidante não foi eficiente a ponto de impedir os danos de peroxidação lipídica.

O ânion superóxido pode reagir com biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podendo causar injúrias em estruturas celulares, inativação enzimática, danos ao DNA, peroxidação lipídica (LPO) e

morte celular (IMLAY, 2003), por isso ele é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é um radical, por esse motivo é menos reativo, entretanto, pode se difundir mais facilmente que os radicais pelas membranas de diversas organelas, como as mitocôndrias e retículo endoplasmático, dessa forma pode afetar biomoléculas em locais distantes de sua origem, além disso, pode mimetizar o  $\text{Fe}^{2+}$ , o qual irá aumentar de concentração e através da reação de Fenton ser convertido em radical hidroxila, altamente reativo a biomoléculas localizadas ao seu redor (TOMANEK, 2015).

Outra enzima altamente importante no combate ao estresse oxidativo é a GST, a qual apresentou respostas diferentes nas exposições individuais e na mistura binária de cádmio e fenantreno. Individualmente os poluentes reduziram a atividade da enzima e na mistura provocaram um aumento. Por ser uma grande família de enzimas as quantificações de GST podem apresentar comportamentos distintos dependendo do tempo e dos poluentes a que estão expostos (MARTÍNEZ-PAZ et al., 2012). Cada membro dessa superfamília pode responder a diferentes compostos tóxicos ou podem trabalhar em conjunto na desintoxicação dos poluentes, portanto, é difícil descobrir qual enzima é a principal responsável pela desintoxicação de um composto específico (XU et al., 2015). Entretanto, é possível indicar que o quadro de estresse oxidativo observado na mistura dos poluentes pode ter levado a esse comportamento distinto da enzima na mistura.

As enzimas de desintoxicação EST alfa e EST beta apresentaram reduções mais severas na exposição individual de cádmio. Reduções das EST alfa e EST beta já foram relatadas em *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822 (Actinopterygii: Cypriniformes), expostos ao metal cádmio (DE LIMA, et al., 2013). A exposição ao fenantreno também reduziu as atividades das esterases alfa e beta, mas na mistura binária dos poluentes não foram verificadas alterações, apenas da EST beta na mistura com concentração mais elevada. Estes resultados indicam que a co-exposição entre o cádmio e o fenantreno não altera a bioquímica dessas enzimas.

A quantificação da enzima AChE é amplamente utilizada como biomarcador de exposição a compostos neurotóxicos em invertebrados,



incluindo Chironomidae (JIN-CLARK et al., 2002; RAKOTONDRAVELO et al., 2006; PRINTES et al., 2011; REBECHI et al., 2014). A exposição ao cádmio causou inibições na enzima AChE. Resultados semelhantes foram observados para espécie de peixe *Danio rerio* após tratamento com cádmio (DE LIMA et al., 2013). Como as AChE são enzimas alostéricas, ou seja, apresentam uma região separada daquela em que se liga o substrato e portanto, moléculas regulatórias podem ligar-se e modificar a atividade catalítica da enzima, numerosas mudanças conformacionais podem ocorrer, as quais podem ser influenciadas por ligação a metais pesados (FORGET et al., 1999).

A exposição ao fenantreno apresentou inibições da AChE apenas na concentração mais alta avaliada. Inibições da AChE já foram relatadas em *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Clitellata) expostos ao fenantreno (NAM et al., 2015). Os autores indicam que essa alteração na atividade da enzima pode estar relacionada a alterações na expressão de AChE em vez da direta inibição da enzima pelo HPA.

A mistura de cádmio e fenantreno apresentou maiores inibições na atividade da AChE em relação as exposições individuais e como na exposição de fenantreno a influência foi menor que na exposição ao cádmio, pode-se dizer que o cádmio é o composto que está direcionando as maiores alterações, embora tanto os metais como os HPAs já tenham sido relatados como inibidores da AChE (LIONETTO et al., 2003).

O conteúdo total das hemoglobinas e a expressão gênica destas foram reduzidos principalmente na exposição ao cádmio e na mistura binária de cádmio e fenantreno. Estes resultados indicam que o fenantreno não está influenciando tanto as hemoglobinas em *Chironomus sancticaroli*, mas em mistura os efeitos do metal e do HPA são potencializados.

Esses efeitos nas hemoglobinas e nos outros biomarcadores bioquímicos mensurados indicam o quanto a mistura do cádmio e fenantreno é tóxica para *Chironomus sancticaroli*, principalmente no que diz respeito ao equilíbrio redox desses insetos. Em geral, a co-exposição de metais e HPAs podem levar a efeitos sinérgicos após interação dos poluentes e em termos de avaliação de risco ecológico essas interações são as mais preocupantes. As potenciais interações entre esses estressores ambientais são complexas,

principalmente por envolverem os processos de transporte, metabolismo e desintoxicação dos poluentes (GAUTHIER et al., 2014). Esta complexidade em entender as interações da mistura de metais e hidrocarbonetos é um indicativo do quanto ainda temos que avançar nesses estudos visando o monitoramento das águas e a conservação da biota aquática.

### Comparação Cádmio, Malathion e Fenantreno

Cádmio, malathion e fenantreno estão entre as substâncias químicas consideradas como poluentes prioritários pela União Européia (Council Directive 2006/11/EC, Dangerous Substances) e pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA). A ocorrência simultânea destes três poluentes em ambientes aquáticos (MEHLER et al., 2011) torna o conhecimento das interações entre eles relevantes para a proteção da biota aquática.

A coexistência de cádmio e malathion pode aumentar a absorção de poluentes orgânicos em sedimentos de ecossistemas aquáticos, como demonstrado por QIAN et al. (2011), que relataram maior absorção do herbicida atrazina na presença de cádmio e malathion na mistura terciária dos poluentes. Dessa forma, os poluentes orgânicos ficam ligados aos sedimentos e não estarão disponíveis a processos de degradação. Após perturbações do meio, como dragagens, alterações de pH, dureza e outros fatores abióticos, poderão se tornar biodisponíveis novamente e possivelmente irão interagir com a biota aquática.

O inseticida malathion foi mais tóxico com  $CL_{50}$  48h de  $0,1006 \text{ mg L}^{-1}$ , em seguida o fenantreno com  $CL_{50}$  48h de  $2,44 \text{ mg L}^{-1}$  e por último o cádmio com  $CL_{50}$  48h de  $7,4 \text{ mg L}^{-1}$ , portanto, a relação decrescente de toxicidade foi: malathion>fenantreno>cádmio. Entretanto, essa relação não se manteve quando analisados os biomarcadores bioquímicos, os quais indicaram uma inversão na ordem de toxicidade, sendo malathion>cádmio>fenantreno. As diferenças entre os resultados de mortalidade e bioquímicos indicam que o malathion é o composto mais tóxico independente do marcador utilizado e o cádmio é um composto que afeta mais a bioquímica do organismo quando comparado ao fenantreno. Para análise de risco ambiental as combinações de

diferentes biomarcadores irão caracterizar mais fielmente o cenário de impacto ambiental e auxiliar na tomada de decisões.

A mistura terciária dos poluentes apresentou um número mais expressivo de larvas com alteração de comportamento e mortas em relação às exposições individuais, indicando um efeito potencializado da mistura. Este resultado ficou evidente através dos modelos CA e IA, para os quais a premissa de adição não foi corroborada e, portanto o sinergismo foi indicado como resultado para a toxicidade da mistura. A maioria das pesquisas envolvendo mistura terciária de poluentes é realizada com compostos pertencentes à mesma classe, como é o caso de metais (BATOOL; JAVED, 2015; VAN GINNEKEN et al., 2015), inseticidas (WILLMOTT et al., 2013; MEIJER et al., 2014; HASENBEIN et al., 2015) e HPAs (WILLIS; ORIS, 2014). Poucos estudos relatam a utilização dos modelos CA e IA para se prever a toxicidade de misturas com três classes diferentes de poluentes, justamente pela dificuldade em se entender as interações que podem ocorrer.

A enzima AChE foi inibida por todos os poluentes nas exposições isoladas. Porém, em se tratando das mesmas unidades tóxicas (0,5 e 1UT) é possível afirmar que o malathion apresenta maior neurotoxicidade do que o cádmio e o fenantreno, resultado explicado pela alta especificidade no modo de ação dos inseticidas organofosforados (OF) (CASIDA; DURKIN, 2013). Já na mistura terciária as inibições da AChE foram extremamente altas, chegando a 97%, indicando o potencial neurotóxico que a mistura terciária desses compostos possui e reforçando as influências que os metais e HPAs exercem na AChE (JETT et al., 1999; LIONETTO et al., 2003; RICCIARDI et al., 2010).

Nas exposições individuais o malathion foi o composto que mais apresentou alterações nas atividades das enzimas EST alfa e EST beta. Na mistura terciária de cádmio, malathion e fenantreno as reduções foram maiores em relação aos compostos isolados. Estes resultados indicam que provavelmente o malathion é o principal composto atuando nas alterações das enzimas, mas existe uma influência de todos os poluentes em mistura, já que o organismo necessita desintoxicar diversos estressores ao mesmo tempo e as EST alfa e beta já foram relatadas como importantes enzimas de

desintoxicação de inseticidas, metais e HPAs (NOUSIAINEN et al., 1984; POUPARDIN et al., 2008; ZHANG et al., 2014; ZHANG, et al., 2015)

A enzima antioxidante SOD apresentou aumentos de atividade na exposição individual de malathion. Este aumento de atividade não impediu o quadro de estresse oxidativo, estado indicado pelos danos de peroxidação lipídica encontrados para a exposição. Já as exposições individuais ao cádmio e ao fenantreno a atividade da SOD também aumentou, entretanto, nenhum dano de LPO foi observado, portanto o estresse oxidativo foi observado apenas na exposição ao malathion.

A atividade da enzima antioxidante CAT não sofreu alterações nas exposições individuais. Já na exposição terciária dos poluentes, tanto a CAT como a SOD apresentaram aumentos, assim como conteúdo de hidroperóxidos elevado, indicando um cenário de estresse oxidativo alto, o qual gerou danos nos lipídeos de membrana e possivelmente comprometendo diversos componentes celulares (TOMANEK, 2015).

No presente trabalho, a atividade das GSTs não foram alteradas na exposição ao malathion e tiveram reduções na exposição ao fenantreno e mais severamente na exposição ao cádmio. Na mistura terciária dos poluentes as reduções foram maiores que nas exposições individuais. As GSTs são enzimas multifuncionais envolvidas na desintoxicação de xenobióticos em células procarióticas e eucarióticas. Em geral, elas conjugam o grupo tiol da glutathione (GSH) com compostos que apresentam centros eletrofílicos. Através desse mecanismo diversos substratos podem ser eliminados da célula, tornando-os mais solúveis em água e, portanto mais facilmente transportados (KETTERMAN et al., 2011). Essa baixa especificidade de substratos apresentada pela enzima pode explicar o motivo de todos os poluentes terem influenciado a atividade da enzima GST em mistura. Além disso, o quadro de estresse oxidativo citado anteriormente corrobora mais uma vez a influência dos poluentes sobre a atividade da enzima, a qual também apresenta função de peroxidase (HAYES et al., 2005).

Manter a atividade alta de enzimas como AChE, SOD e GPx exige maior gasto energético e em casos de exposição a fatores de estresse

adicional, como a mistura de mais compostos, pode perturbar e prejudicar outros processos importantes (AUGUSTYNIAK et al., 2005).

Nas exposições individuais o conteúdo total de hemoglobina mensurado foi afetado principalmente pelo cádmio, seguido do fenantreno e malathion. Já a expressão gênica das Hbs foi afetada especialmente pelo cádmio, seguido pelo malathion e por último fenantreno. Estes resultados podem ser explicados pelo fato do malathion ter a expressão gênica de algumas Hbs reduzidas e outras aumentadas, o que pode ter refletido em um conteúdo total de Hbs inalterado. Já para o cádmio e fenantreno os efeitos encontrados foram apenas reduções de expressão.

A mistura terciária dos compostos resultou em elevação e redução da expressão gênica dependendo da Hb, entretanto, o conteúdo total foi severamente reduzido. Estes resultados indicam que não existe relação direta entre a expressão gênica e o conteúdo de hemoglobina quantificado, como já demonstrado em outros estudos com Chironomidae (CHOI; HA, 2009). Além disso, foi possível indicar que a mistura terciária afetou mais as Hbs em *C. sancticaroli* do que as exposições individuais. Essas reduções de Hb comprometem tanto as vias respiratórias do inseto, por diminuírem o conteúdo de pigmento respiratório responsável pelo transporte de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, como o sistema antioxidante, já que as funções de peroxidases dessas Hbs ficam reduzidas (SHOBANOV, 2004).

De acordo com o resultado da análise de componentes principais com os poluentes isolados e a mistura terciária (Figura 49A) é possível afirmar que o malathion e o cádmio podem ser considerados os poluentes que estão direcionando a toxicidade da mistura e o fenantreno estaria contribuindo menos, pois as respostas das exposições individuais de cádmio e de malathion ficaram mais próximas do encontrado para a mistura terciária.

Os biomarcadores bioquímicos e moleculares evidenciaram alta toxicidade dos poluentes cádmio, malathion e fenantreno, principalmente na mistura terciária. As interações metabólicas entre inseticidas OF, metais e HPAs são extremamente complexas, entretanto, foi possível indicar sinergismo entre essas três classes de poluentes amplamente encontradas nos ambientes aquáticos.

Informações como as produzidas neste trabalho são relevantes e se fazem cada vez mais necessárias, uma vez que o ambiente é amplamente impactado pela atividade antrópica, sendo neste cenário mais provável a ocorrência de compostos com elevada diversidade de origem e natureza afetando a saúde da biota e dos ecossistemas aquáticos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em consideração o endpoint mortalidade, o inseticida malathion se mostrou mais tóxico para *Chironomus sancticaroli*, seguido do HPA fenantreno e por último o metal cádmio. Entretanto, essa relação de toxicidade não se mantém em relação aos biomarcadores bioquímicos e moleculares, os quais indicaram o inseticida malathion como mais tóxico para a espécie, seguido do metal cádmio e por último o HPA fenantreno. Portanto, os biomarcadores podem ser considerados mais sensíveis para se determinar a toxicidade de poluentes do que o *endpoint* mortalidade.

Os biomarcadores bioquímicos e moleculares indicaram alta toxicidade dos poluentes cádmio, malathion e fenantreno para *C. sancticaroli* e as misturas binárias e terciárias, no geral, tiveram efeitos sinérgicos, indicando interação entre os compostos e por esse motivo desvios nos modelos *Concentration Addition* e *Independent Action*. Portanto, as misturas foram mais tóxicas que as exposições individuais, o que não necessariamente era esperado, pois diversas interações, dentre elas as antagônicas, poderiam ocorrer, ou até mesmo a ausência de interações, o que resultaria na adição dos efeitos individuais dos poluentes.

Analisando-se todos os tratamentos em conjunto é possível indicar que a mistura binária de cádmio e malathion e a mistura terciária dos poluentes tiveram respostas semelhantes, indicando pouca influência do HPA fenantreno na mistura e forte interação entre cádmio e malathion.

Diante dos marcadores utilizados é possível afirmar que os três poluentes quando em misturas podem ser considerados neurotóxicos, capazes de gerar alterações metabólicas e estresse oxidativo, gerando danos de peroxidação lipídica e reduções de conteúdo de hemoglobinas, pigmento importante e necessário na fisiologia desses insetos.

É importante salientar a direta relação entre os efeitos observados e as concentrações utilizadas dos poluentes, tornando imprescindível a mensuração das concentrações biodisponíveis dos compostos avaliados.

As informações obtidas buscaram compreender o papel de misturas de diferentes classes de poluentes ambientalmente relevantes em ecossistemas aquáticos em organismo representante da fauna brasileira. A utilização de diversas ferramentas é extremamente necessária para a devida caracterização das exposições de poluentes e na avaliação de risco ecológico essa combinação de biomarcadores deveria ser a prática mais comum, entretanto não é o que se observa nas diretrizes estabelecidas em diversos órgãos ambientais, os quais se utilizam muitas vezes apenas do *endpoint* mortalidade para tais caracterizações.

Os dados apresentados relacionam aspectos bioquímicos e moleculares com a mortalidade observada, indicando possíveis vias de interação entre os xenobióticos investigados, os quais poderão auxiliar no direcionamento de futuros estudos diretamente ligados à avaliação de risco ecológico e conservação da biota dos ecossistemas aquáticos.



## REFERÊNCIAS

- ADAPAR. **Agência de defesa agropecuária do Paraná**. Disponível em: < <http://www.adapar.pr.gov.br/>> Acesso em: 10/10/2015.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- ALVES, R. I. DA S. A.; TONANI, K. A. DE A.; NIKAIIDO, M.; et al. Evaluation of heavy metal levels in surface water and sediments of Monte Alegre Stream and tributaries, Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 5, n. 3, p. 122–132, 2010.
- AMORIM, M. J. B.; PEREIRA, C.; MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; et al. Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil. **Environmental Pollution**, v. 160, n. 1, p. 145–152, 2012.
- ATSDR. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 1995.
- ATSDR. Toxicological profile for malathion. **Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service**, 2003.
- ATSDR. Public health statement for cadmium. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 2012.
- AUGUSTYNIAK, M.; BABCZYŃSKA, A.; MIGULA, P.; et al. Joint effects of dimethoate and heavy metals on metabolic responses in a grasshopper (*Chorthippus brunneus*) from a heavy metals pollution gradient. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 141, n. 4, p. 412–419, 2005.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 219, n. 1-4, p. 215–224, 2011a.
- AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1210–1215, 2011b.
- BACKHAUS, T.; SCHOLZE, M.; GRIMME, L. H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1-2, p. 49–61, 2000.
- BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic

environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320–325, 2010. Elsevier.

BATOOL, U.; JAVED, M. Synergistic effects of metals (cobalt, chromium and lead) in binary and tertiary mixture forms on *Catla catla*, *Cirrhina mrigala* and *Labeo rohita*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 47, n. 3, p. 617–623, 2015.

BÉCHARD, K. M.; GILLIS, P. L.; WOOD, C. M. Trophic transfer of Cd from larval chironomids (*Chironomus riparius*) exposed via sediment or waterborne routes, to zebrafish (*Danio rerio*): Tissue-specific and subcellular comparisons. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 4, p. 310–321, 2008.

BEDUK, F.; AYDIN, M. E.; OZCAN, S. Degradation of malathion and parathion by ozonation, photolytic ozonation, and heterogeneous catalytic ozonation processes. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 40, n. 2, p. 179–187, 2012.

BEKETOV, M. A.; KEFFORD, B. J.; SCHÄFER, R. B.; LIESS, M. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 11039–11043, 2013.

BELDEN, J. B.; GILLIOM, R. J.; LYDY, M. J. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3, n. 3, p. 364–372, 2007.

BENCIC, D. C. The Challenge: Real-world application of 'omics endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 700–706, 2015.

BEYER, J.; PETERSEN, K.; SONG, Y.; et al. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 81–91, 2014.

BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 35–67, 2014.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRUYN, W. J.; CLARK, C. D.; OTTELLE, K.; AIONA, P. Photochemical degradation of phenanthrene as a function of natural water variables modeling freshwater to marine environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 3, p. 532–538, 2012.

BRZUZAN, P.; GORA, M.; LUCZYNSKI, M. K.; WOZNY, M. Cyclopenta[c]phenanthrenes - Chemistry and biological activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 204, n. 1, p. 58–65, 2013.

BURCZYNSKI, M. E.; PENNING, T. M. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. **Cancer Research**, v. 60, n. 4, p. 908–915, 2000.

CACCIATORE, L. C.; VERRENGIA GUERRERO, N.; COCHÓN, A. C. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 128-129, p. 124–134, 2013. Elsevier B.V.

CAMPO, J.; MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 263, p. 146–157, 2013.

CAPOBIANGO, H. L. V.; CARDEAL, Z. L. A solid-phase microextraction method for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in fish, water, potatoes, guava and coffee. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 5, p. 907–914, 2005.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 99–117, 2013.

CAVALCANTI, P.; RODRIGUES, L.; BEIJO, L.; et al. Contamination from an affluent of Furnas reservoir by trace metals. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 877–885, 2014.

CEDERGREEN, N. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

CEDERGREEN, N.; SØRENSEN, H.; SVENDSEN, C. Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results? **Science of the Total Environment**, v. 427-428, p. 229–237, 2012.

CHAGNON, M.; KREUTZWEISER, D.; MITCHELL, E. A. D.; et al. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 119–134, 2014.

CHARALAMPOUS, N.; KINDOU, A.; VLASTOS, D.; et al. A multidisciplinary assessment of river surface water quality in areas heavily influenced by human activities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, p. 208–222, 2015.

CHARLES, J.; CRINI, G.; DEGIORGI, F.; et al. Unexpected toxic interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) exposed to binary copper and nickel mixtures. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 2, p. 1099–1111, 2014.

CHEN, M.; GRAEDEL, T. E. The potential for mining trace elements from phosphate rock. **Journal of Cleaner Production**, v. 91, p. 337–346, 2015.

CHIBA, W. A. C.; PASSERINI, M. D.; BAIO, J. A. F.; TORRES, J. C.; TUNDISI, J. G. Seasonal study of contamination by metal in water and sediment in a sub-basin in the southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 4, p. 833–843, 2011.

CHOI, J.; HA, M.-H. Effect of cadmium exposure on the globin protein expression in 4th instar larvae of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae): an ecotoxicoproteomics approach. **Proteomics**, v. 9, n. 1, p. 31–39, 2009.

CHRISTEN, V.; CRETZAZ, P.; FENT, K. Additive and synergistic antiandrogenic activities of mixtures of azol fungicides and vinclozolin. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 279, p. 455–466, 2014.

CLAYTON, C. A.; PELLIZZARI, E. D.; WHITMORE, R. W.; et al. Distributions, associations, and partial aggregate exposure of pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Minnesota Children's Pesticide Exposure Study (MNCPEs). **Journal of exposure analysis and environmental epidemiology**, v. 13, n. 2, p. 100–111, 2003.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 357/05 – Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <www.mma.gov.br>.

Council Directive 2006/11/EC, Dangerous Substances. ., p. 52–59.

D'AGOSTINO, R. B.; RUSSEL, H. K. Scree Test. **Encyclopedia of Biostatistics**, 2005. John Wiley & Sons, Ltd.

DAY, K. E.; SCOTT, I. M. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. **Aquatic Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 101–113, 1990.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.

DIAMOND, M. L.; WIT, C. A DE; MOLANDER, S.; et al. Exploring the planetary boundary for chemical pollution. **Environment International**, v. 78, p. 8–15, 2015.

DIXIT, R.; WASIULLAH, E.; MALAVIYA, D.; et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability**, v. 7, n. 2, p. 2189–2212, 2015.

DONAHUE, W. F.; ALLEN, E. W.; SCHINDLER, D. W. Impacts of coal-fired power plants on trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments in central Alberta, Canada. **Journal of Paleolimnology**, v. 35, n. 1, p. 111–128, 2006.

DOONG, R. A.; LIN, Y. T. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. **Water Research**, v. 38, n. 7, p. 1733–1744, 2004.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**, 2006.

DURAN, M.; MICHAILOVA, P.; SARI, A.; et al. Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 64, n. Supl. 4, p. 167–173, 2012.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES-JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A nem and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. 1990.

ENVIRONMENTAL INTEGRITY PROJECT AND EARTH JUSTICE. **.Stant, J. (Ed.), Out of Control: Mounting Damages from Coal Ash Waste Sites**. Washington, DC, 2010.

FADAEI, A.; KARGAR, M. Removal of malathion from various waters by advanced oxidation processes. **Journal of The Chemical Society Of Pakistan**, v. 37, n. 01, p. 39–45, 2015.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; VALENZUELA-ENCINAS, C.; MARSCH, R.; et al. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 12–30, 2011.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. D. F. M.; SOARES FILHO, A. M.; CARVALHO, A. A. The historical evolution of dengue prevention and control programs in Brazil. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 14, n. 3, p. 961–972, 2009.

FIGUEIREDO, E. A.; GOMEZ, M. V.; HENEINE, I. F.; SANTOS, I. O.; HARGREAVES, F. B. Isolation and physicochemical properties of the hemoglobin of biomphalaria glabrata (Mollusca, Planorbidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 44, n. 2, p. 481–491, 1973.

FLORES-TENA, F. J.; MARTÍNEZ-TABCHET, L. The effect of chromium on the hemoglobin concentration of *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, n. 3, p. 196–202, 2001.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 2, p. 153–161, 2004.

FORGET, J.; PAVILLON, J.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 912–918, 1999.

FRANZ, C.; ABBT-BRAUN, G.; LORZ, C.; ROIG, H. L.; MAKESCHIN, F. Assessment and evaluation of metal contents in sediment and water samples within an urban watershed: an analysis of anthropogenic impacts on sediment and water quality in Central Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 72, n. 12, p. 4873–4890, 2014.

FROEHNER, S.; MACENO, M.; MACHADO, K. S. Predicting bioaccumulation of PAHs in the trophic chain in the estuary region of Paranagua, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 174, n. 1-4, p. 135–145, 2011.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1-4, p. 345–63, 2003.

GAO R.; YUAN Z.; ZHAO Z.; GAO X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.

GAUTHIER, P. T.; NORWOOD, W. P.; PREPAS, E. E.; PYLE, G. G. Metal–PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 253–269, 2014.

GEIST, J. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. **Ecological Indicators**, v. 11, n. 6, p. 1507–1516, 2011.

GINNEKEN, M. VAN; JONGE, M. DE; BERVOETS, L.; BLUST, R. Uptake and toxicity of Cd, Cu and Pb mixtures in the isopod *Asellus aquaticus* from waterborne exposure. **Science of the Total Environment**, v. 537, p. 170–179, 2015.

GIROTTI, A. W. Introduction to serial reviews on regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 153, 2002.

GONZÁLEZ, J. C. R.; GUERRA, I. R. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos Cytochrome P450 system and xenobiotic metabolism. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 48, n. 2, p. 495–507, 2014.

GRINTZALIS, K.; GEORGIU, C. D.; DAILIANIS, S. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. **Marine Environmental Research**, v. 81, p. 26–34, 2012.

GUMPU, M. B.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. A review on detection of heavy metal ions in water – an electrochemical approach. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 515–533, 2015.

GUPTA, S.; PATHAK, B.; FULEKAR, M. H. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 2, p. 241–269, 2015. Springer Netherlands.

GUST, K. A.; FLEEGER, J. W. Exposure-related effects on Cd bioaccumulation explain toxicity of Cd-phenanthrene mixtures in *Hyalella azteca*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 2918–2926, 2005.

HA, M.-H.; CHOI, J. Chemical-induced alteration of hemoglobin expression in the 4th instar larvae of *Chironomus tentans* Mg. (Diptera: Chironomidae). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 393–398, 2008a.

HA, M.-H.; CHOI, J. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarker for ecotoxicity monitoring. **Chemosphere**, v. 71, p. 1928–1936, 2008b.

HAIDER, S.; ANIS, L.; BATOOL, Z.; et al. Short term cadmium administration dose dependently elicits immediate biochemical, neurochemical and neurobehavioral dysfunction in male rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 1, p. 83–92, 2015.

HASENBEIN, S.; LAWLER, S. P.; GEIST, J.; CONNON, R. E. The use of growth and behavioral endpoints to assess the effects of pesticide mixtures upon aquatic organisms. **Ecotoxicology**, p. 746–759, 2015.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, 2005.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 371–391, 2000.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1527–1535, 2003.

HOCHMUTH, J. D.; ASSELMAN, J.; SCHAMPHELAERE, K. A C. DE. Are interactive effects of harmful algal blooms and copper pollution a concern for water quality management? **Water Research**, v. 60, p. 41–53, 2014.

HSIEH, Y.-L.; YEH, Y.-H.; LEE, Y.-T.; HUANG, C.-Y. Protective effects of Cholestin on ethanol induced oxidative stress in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 4, p. 799–808, 2015.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 395–418, 2003.

JAMES, R. R.; XU, J. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 2, p. 175–182, 2012.

JARAMILLO C, B. E.; MARTELO E, I.; DUARTE R, E. Acute toxicity of organophosphorus pesticides and analysis of quantitative structure - activity relationship (Qsar). **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 11, n. 2, p. 76–84, 2013.

JEE, J.-H.; KANG, J.-C. Effect of phenanthrene on haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegel). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 14, p. 1310–1317, 2004.

JETT, D. A.; NAVOA, R. V; LYONS, M. A. Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro. **Toxicology Letters**, v. 105, n. 3, p. 223–9, 1999.

JIA, H.; CHEN, H.; NULAJI, G.; LI, X.; WANG, C. Effect of low-molecular-weight organic acids on photo-degradation of phenanthrene catalyzed by Fe(III)–smectite under visible light. **Chemosphere**, v. 138, p. 266–271, 2015.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384–389, 1992.

JIN-CLARK, Y.; LYDY, M. J.; ZHU, K. Y. Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 21, n. 3, p. 598–603, 2002.

KAMALADEVI, A.; GANGULI, A.; KUMAR, M.; BALAMURUGAN, K. Lactobacillus casei protects malathion induced oxidative stress and macromolecular changes in *Caenorhabditis elegans*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 3, p. 213–223, 2013.



KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KETTERMAN, A. J.; SAISAWANG, C.; WONGSANTICHON, J. Insect glutathione transferases. **Drug metabolism reviews**, v. 43, n. 2, p. 253–65, 2011.

KIM, H.; KOEDRITH, P.; SEO, Y. Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12261–12287, 2015.

KRALJ, M. B.; FRANKO, M.; TREBŠE, P. Photodegradation of organophosphorus insecticides - Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. **Chemosphere**, v. 67, p. 99–107, 2007.

LANG, G.-J.; ZHU, K. Y.; ZHANG, C.-X. Can acetylcholinesterase serve as a target for developing more selective insecticides? **Current Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 495–501, 2012.

LANGER-JAESRICH, M.; KIENLE, C.; KÖHLER, H. R.; GERHARDT, A. Impairment of trophic interactions between zebrafish (*Danio rerio*) and midge larvae (*Chironomus riparius*) by chlorpyrifos. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1294–1301, 2010.

LANGER-JAESRICH, M.; KOHLER, H.-R.; GERHARDT, A. Assessing toxicity of the insecticide thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 963–972, 2010.

LEE, S. M.; LEE, S. B.; PARK, C. H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074–1081, 2006.

LEE, S. W.; CHOI, J. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 269–274, 2009.

LEE, S.-M.; LEE, S.-B.; PARK, C.-H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, p. 1074–1081, 2006.

LETICIA, A. G.; GERARDO, G. B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 787–797, 2008.

LIMA, D. DE; ROQUE, G. M.; ALMEIDA, E. A. DE. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45–51, 2013.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, n. 1-2, p. 137–147, 2009.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALISI, A.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Research International**, , n. 1, p. 8, 2013.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; et al. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 324–330, 2003.

LIU, Z.; HE, L.; LU, Y.; et al. Distribution, source, and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Hun River, northeast China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 5, p. 290, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ, E.; ARCE, C.; OSET-GASQUE, M. J.; CAÑADAS, S.; GONZÁLEZ, M. P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 940–951, 2006.

LOPEZ-MARTINEZ, G.; ELNITSKY, M. A.; BENOIT, J. B.; LEE, R. E.; DENLINGER, D. L. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 8, p. 796–804, 2008.

LÜCHMANN, K. H.; DAFRE, A. L.; TREVISAN, R.; et al. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324–334, 2014.

LUSHCHAK, V. I. Chemico-Biological Interactions Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MAHANTY, B.; PAKSHIRAJAN, K.; DASU, V. V. Understanding the complexity and strategic evolution in PAH remediation research. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 19, p. 1697–1746, 2011.

MAIER, K. J.; KOSALWAT, P.; KNIGHT, A. W. Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and the effect of temperature on its life history. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 1681-1688, 1990.

MANSOUR, S. A.; SIDKY, M. M. Ecotoxicological Studies. 6. The first comparative study between Lake Qarun and Wadi El-Rayan wetland (Egypt), with respect to contamination of their major components. **Food Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 181–189, 2003.

MARETTOVÁ, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 1–10, 2015.

MARTÍNEZ-PAZ, P.; MORALES, M.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, v. 155, n. 2, p. 333–343, 2012.

MARTINS, M.; COSTA, P. M.; FERREIRA, A. M.; COSTA, M. H. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 85–95, 2013.

MCCARTY, L. S.; OZBURN, G. W.; SMITH, A. D.; DIXON, D. G. Toxicokinetic modeling of mixtures of organic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 1037–1047, 1992.

MEHLER, W. T.; LI, H.; LYDY, M. J.; YOU, J. Identifying the causes of sediment-associated toxicity in urban waterways of the pearl river delta, China. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 5, p. 1812–1819, 2011.

MEHLER, W. T.; SCHULER, L. J.; LYDY, M. J. Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 217–224, 2008.

MEIJER, M.; DINGEMANS, M. M. L.; BERG, M. VAN DEN; WESTERINK, R. H. S. Inhibition of voltage-gated calcium channels as common mode of action for (mixtures of) distinct classes of insecticides. **Toxicological Sciences**, v. 141, n. 1, p. 103–111, 2014.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188–201, 2007.

MENG, J.; YANG, B.; ZHANG, Y.; DONG, X.; SHU, J. Heterogeneous ozonation of suspended malathion and chlorpyrifos particles. **Chemosphere**, v. 79, n. 4, p. 394–400, 2010.

MICHAILOVA, P.; ILKOVA, J.; DURAN, M.; et al. Structural and functional alterations in salivary gland chromosomes and enzyme activity of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from anthropogenically polluted sites in Bulgaria and Turkey. **Caryologia**, v. 65, n. 2, p. 157–169, 2012.

MIELKE, H. W.; WANG, G.; GONZALES, C. R.; et al. PAH and metal mixtures in New Orleans soils and sediments. **Science of the Total Environment**, v. 281, n. 1-3, p. 217–227, 2001.

MOGREN, C. L.; TRUMBLE, J. T. The impacts of metals and metalloids on insect behavior. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 135, n. 1, p. 1–17, 2010.

MORAIS, G. DOS S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genotoxic effect of phenanthrene on *Chironomus sancticarli* (Diptera:Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.

MUNIZ, P.; DANULAT, E.; YANNICELLI, B.; et al. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). **Environment International**, v. 29, n. 8, p. 1019–1028, 2004.

NAIR, A. R.; DEGHESELLE, O.; SMEETS, K.; KERKHOVE, E. VAN; CUYPERS, A. Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost (or not)? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6116–6143, 2013.

NAIR, P. M. G.; CHOI, J. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 3-4, p. 550–560, 2011. Elsevier B.V.

NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; CHOI, J. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 154, n. 4, p. 399–408, 2011.

NAM, T.-H.; JEON, H.-J.; MO, H.-H.; et al. Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Geochemistry and Health**, v. 37, n. 6, p. 943–951, 2015.

NIGAM, A. K.; KUMARI, U.; MITTAL, S.; MITTAL, A. K. Characterization of carboxylesterase in skin mucus of *Cirrhinus mrigala* and its assessment as biomarker of organophosphate exposure. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 635–644, 2014.

NISHIGIMA, F. N.; WEBER, R. R.; BÍCEGO, M. C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 11, p. 1064–1072, 2001.

NOGUEIRA, E. N.; DORES, E. F. G. C.; PINTO, A. A.; et al. Currently used pesticides in water matrices in central-western Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 8, p. 1476–1487, 2012.

NØRGAARD, K. B.; CEDERGREEN, N. Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n. 4, p. 957–967, 2010.

NOUSIAINEN, U.; TÖRRÖNEN, R.; HÄNNINEN, O. Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. **Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 243–251, 1984.

OECD. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, 2000.

OECD. Guideline for the testing of chemicals, 2011.

OH, J. T.; EPLER, J. H.; BENTIVEGNA, C. S. A rapid method of species identification of wild chironomids (Diptera: Chironomidae) via electrophoresis of hemoglobin proteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–13, 2014.

OLMSTEAD, A. W.; LEBLANC, G. A. Toxicity assessment of environmentally relevant pollutant mixtures using a heuristic model. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 1, n. 2, p. 114–122, 2005.

OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2003.

PALAKSHA; SHAKUNTHALA, V. Variations in the esterase expression pattern with respect to different light regimes in *Drosophila agumbensis* and *Drosophila nagarholensis*. **Biological Rhythm Research**, v. 46, n. 4, p. 553–564, 2015.

PANG, Y.-P.; BRIMIJOIN, S.; W. RAGSDALE, D.; YAN ZHU, K.; SURANYI, R. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 471–482, 2012.

PARK, S. Y.; NAIR, P. M. G.; CHOI, J. Characterization and expression of superoxide dismutase genes in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae as a potential biomarker of ecotoxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 156, n. 3-4, p. 187–194, 2012.

PATHIRATNE, A.; GEORGE, S. G. Toxicity of malathion to nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. **Aquatic Toxicology**, v. 43, p. 261–271, 1998.

PEREZ, D. G.; FONTANETTI, C. S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: A review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 177, n. 1-4, p. 437–447, 2011.

PINO, J. DEL; ZEBALLOS, G.; ANADON, M. J.; et al. Higher sensitivity to cadmium induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons: a cholinesterase dependent mechanism. **Toxicology**, v. 325, p. 151–9, 2014.

POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; et al. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 540–551, 2008.

PRAET, N. VAN; JONGE, M. DE; STOKS, R.; BERVOETS, L. Additive effects of predator cues and dimethoate on different levels of biological organisation in the non-biting midge *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 236–243, 2014.

PRINTES, L. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FERNANDES, M. N. Biochemical biomarkers in individual larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 1, p. 53–60, 2007.

PRINTES, L. B.; FERNANDES, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 424–430, 2011.

QIAN, G.; AO, W.; YU, L. Combined effect of co-existing heavy metals and organophosphate pesticide on adsorption of atrazine to river sediments. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 5, p. 1200–1206, 2011.

RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E.; ZHU, K. Y. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, 2006.

RAO, R. J.; WANI, K. A. Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticide residues in water during different seasons of Tighra reservoir Gwalior, Madhya Pradesh, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 11, p. 684, 2015.

REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; et al. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 3, p. 296–301, 2014.

RICCIARDI, F.; MATOZZO, V.; BINELLI, A.; MARIN, M. G. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1725–1736, 2010.

RICHARDI, V. S.; REBECHI, D.; ARANHA, J. M. R.; NAVARRO-SILVA, M. A. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera:Chironomidae) using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RIDER, C. V.; LEBLANC, G. A. Atrazine stimulates hemoglobin accumulation in *Daphnia magna*: Is it hormonal or hypoxic? **Toxicological Sciences**, v. 93, n. 2, p. 443–449, 2006.

RYBERG, K. R.; GILLIOM, R. J. Trends in pesticide concentrations and use for major rivers of the United States. **Science of The Total Environment**, v. 538, p. 431–444, 2015.

SHEN, H.; HUANG, Y.; WANG, R.; et al. Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 12, p. 6415–6424, 2013.

SHI, H.; PEI, L.; GU, S.; et al. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. **Genomics**, v. 100, n. 5, p. 327–335, 2012.

SHOBANOV, N. A. Heterogeneity and heterofunctionality of hemoglobins in bloodworms (Diptera, Chironomidae). **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 40, n. 4, p. 392–397, 2004.

SIDDIQI, H. A.; ANSARI, F. A.; MUNSHI, A. B. Assessment of hydrocarbons concentration in marine fauna due to Tasman Spirit oil spill along the Clifton beach at Karachi coast. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 148, n. 1-4, p. 139–148, 2009.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.

SINGH, B.; KAUR, J.; SINGH, K. Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 146–154, 2014.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, n. 1-3, p. 215–228, 2002.

SPROVIERI, M.; FEO, M. L.; PREVEDELLO, L.; et al. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 998–1009, 2007.

STRIXINO, G.; STRIXINO, S. T. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, n. 4, p. 177–180, 1985.

STRIXINO, S. T.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, p. 183–189, 1982.

SUARES-ROCHA, P.; BRAUNBECK, T.; ANGELIS, D. D. F. DE; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of cytotoxicity and AhR-mediated toxicity in tropical fresh water sediments under the influence of an oil refinery. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 12566–12575, 2015.

TAN, X.; WANG, Z.; CHEN, D.; et al. Study on the interaction of catalase with pesticides by flow injection chemiluminescence and molecular docking. **Chemosphere**, v. 108, p. 26–32, 2014.

TOMANEK, L. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. Pt 12, p. 1867–1879, 2015.

TRAORE, A.; NDIAYE, A.; DIOUF, S.; et al. Assessment of environmental toxic trace metals and pesticides contents in selected fish species from Guiers Lake by using XRF and GC/ECD techniques. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 3, p. 981–990, 2015.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região neotropical (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 33, n. 2, p. 207–216, 1989.

USEPA. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. **US Environmental Protection Agency**, 2000.

USGS. U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, January - Cadmium. , 2015.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R.; RIBEIRO, R. A.; MEDEIROS, P. F. V.; MARTINS-JR, A. J.; LIMA, J. B. P. **Quantification methodology for enzyme**



**activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*.** Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro and Distrito Federal. 129p, 2006.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE; PATTYN, F.; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. Research0034.1 – Research0034.11, 2002.

VIJVER, M. G.; ELLIOTT, E. G.; PEIJNENBURG, W. J.; SNOO, G. R. DE. Response predictions for organisms water-exposed to metal mixtures: A meta-analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1482–1487, 2011.

WANG, B.; DU, Y. Cadmium and its neurotoxic effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013.

WANG, J. Z.; LI, H. Z.; YOU, J. Distribution and toxicity of current-use insecticides in sediment of a lake receiving waters from areas in transition to urbanization. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 128–133, 2012.

WANG, X.; CAI, J.; ZHANG, J.; et al. Acute trimethyltin exposure induces oxidative stress response and neuronal apoptosis in *Sebastiscus marmoratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 58–64, 2008.

WANG, Y.; CHEN, C.; ZHAO, X.; WANG, Q.; QIAN, Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 81–85, 2015.

WATTS, M. M.; PASCOE, D. Comparison of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae ) for assessing the toxicity of sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 1885–1892, 2000.

WEBER, P.; BEHR, E. R.; KNORR, C. D. L.; et al. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 61–66, 2013.

WHO. Who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. **World Health Organization**, p. 1–60, 2009.

WILLIS, A. M.; ORIS, J. T. Acute photo-induced toxicity and toxicokinetics of single compounds and mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2028–2037, 2014.

WILLMOTT, A. L.; CLOYD, R. A.; ZHU, K. Y. Efficacy of pesticide mixtures against the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) under laboratory

and greenhouse conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 1, p. 247–256, 2013.

WORLD BANK GROUP. **Pollution Prevention and Abatement Handbook**. Washington, DC, 1999.

WU, C.; LINDEN, K. G. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides: Roles of hydroxyl and carbonate radicals. **Water Research**, v. 44, n. 12, p. 3585–3594, 2010.

WU, H.; ZHANG, R.; LIU, J.; GUO, Y.; MA, E. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 599–604, 2011.

WU, J. P.; CHEN, H. C.; LI, M. H. Bioaccumulation and toxicodynamics of cadmium to freshwater planarian and the protective effect of N-Acetylcysteine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 2, p. 220–229, 2012.

WU, J.-P.; LEE, H.-L.; LI, M.-H. Cadmium neurotoxicity to a freshwater planarian. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, , n. January, p. 639–650, 2014.

WU, S.; WU, E.; QIU, L.; ZHONG, W.; CHEN, J. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 429–434, 2011.

WUNDERLICH, A. C.; SILVA, R. J.; ZICA, É. O.; et al. The influence of seasonality, fish size and reproductive status on EROD activity in *Plagioscion squamosissimus*: Implications for biomonitoring of tropical/subtropical reservoirs. **Ecological Indicators**, v. 58, p. 267–276, 2015.

XU, Z.-B.; ZOU, X.-P.; ZHANG, N.; FENG, Q.-L.; ZHENG, S.-C. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. **Insect science**, v. 22, n. 4, p. 503–511, 2015.

ZHANG, A. Y. P.; SONG, D. N.; WU, H. H.; et al. Effect of dietary cadmium on the activity of glutathione S- transferase and carboxylesterase in different developmental stages of the *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). **Environmental Entomology**, v. 43, n. 1, p. 171–177, 2014.

ZHANG, G.; PAN, Z.; WANG, X.; MO, X.; LI, X. Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 4, p. 173, 2015.

ZHANG, J.; GE, P.; LI, D.; et al. Two homologous carboxylesterase genes from *Locusta migratoria* with different tissue expression patterns and roles in insecticide detoxification. **Journal of Insect Physiology**, v. 77, p. 1–8, 2015.

ZHANG, T.; ZHOU, X. Y.; MA, X. F.; LIU, J. X. Mechanisms of cadmium-caused eye hypoplasia and hypopigmentation in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 68–76, 2015.

ZHENG, X. Y.; LONG, W. M.; GUO, Y. P.; MA, E. B. Effects of cadmium exposure on lipid peroxidation and the antioxidant system in fourth-instar larvae of *Prosilocerus akamusi* (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 3, p. 827–832, 2011.

ZHOU, J. L.; MASKAOUI, K. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 2, p. 269–281, 2003.